

LUCIANO FERNANDES HUERGO

**CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE *amtB* DE
Azospirillum brasilense FP2**

Monografia apresentada ao curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Paraná para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas

Orientadora: Dra. Leda Satie Chubatsu

CURITIBA

1999



“Não impidas que faça bem aquele que pode:
se podes, faze-o tu mesmo também”

Bíblia Sagrada (Provérbios)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Dra. Leda Satie Chubatsu pela orientação, dedicação e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de compartilhar das instalações do Núcleo de Fixação de Nitrogênio.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza pelas discussões e sugestões que não só contribuíram para o andamento deste trabalho mas também com o aprimoramento da minha formação.

À Ms. Fabiane Rego pela atenção demonstrada e pela manipulação do material radioativo.

Sou grato a todos integrantes do Núcleo de fixação de Nitrogênio em especial a Humberto Ramos, Roseli Wassem, Elaine Benelli, Rose A. Monteiro, Josiane Vitorino e Carolina Galvão pelas discussões, dicas e auxílio prestado.

Aos colegas do Laboratório 316, Luíza, Mariana, Juliana, Lilian e aos todos colegas de graduação pela amizade e companherismo.

A todos os amigos do “BrejaBreak” pela amizade, sem a qual seria impossível vencer o difícil caminho percorrido nestes anos.

Aos técnicos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio Valter de Baura e Roseli Prado pelo excelente trabalho no preparo de parte do material utilizado neste projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao programa PRONEX do Ministério da Ciência e Tecnologia e a FUNPAR pelo suporte financeiro.

A minha família, em especial a minha mãe pelo amor e carinho que sempre estiveram presentes em toda minha vida.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	V
Lista de tabelas	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
Resumo.....	X
1 Introdução	01
1.1 O gênero <i>Azospirillum</i>	01
1.2 A fixação biológica de nitrogênio.....	02
1.3 Assimilação de amônia.....	02
1.4 Sistema <i>ntr</i>	03
1.5 Transporte de amônia.....	05
2 Objetivos	11
3 Material e Métodos	12
3.1 Bactérias, plasmídeos e bacteriófagos	12
3.2 Meios de cultura	12
3.3 Condições de cultivo.....	14
3.4 Antibióticos	15
3.5 Extração do DNA total de <i>A. brasilense</i>	15
3.6 Amplificação de DNA por PCR	16
3.7 Extração de plasmídeo	16
3.8 Clivagem de DNA com endonuclease de restrição	17
3.9 Desfosforilação de plasmídeo	17
3.10 Ligação de DNA	18
3.11 Preparação de bactérias <i>E. coli</i> competentes para eletroporação	18
3.12 Transformação bacteriana por eletroporação.....	18
3.13 Análise de plasmídeos recombinantes	18
3.14 Sequenciamento automático de DNA.....	19
3.14.1 Preparação do material para sequenciamento.....	19
3.15 Separação eletroforética de DNA.....	19
3.16 Purificação de DNA em gel de agarose.....	20
3.17 Isolamento do gene <i>amtB</i> utilizando o banco de genes de <i>A. brasilense</i>	

no cosmídeo pLAFR3	20
3.17.1 Crescimento de alíquotas do banco de genes	20
3.17.2 Transferência do DNA do banco de genes para membranas de nylon.....	20
3.17.3 Hibridização de DNA.....	21
3.18 Construção de uma biblioteca genômica de <i>Azospirillum brasilense</i> no fago λEMBL3.....	21
3.18.1 Preparo do DNA genômico de <i>Azospirillum brasilense</i>	21
3.18.2 Purificação dos braços do λEMBL3	22
3.18.3 Ligação dos braços do λEMBL3 com o DNA total de <i>A. brasilense</i> FP2 cortado.....	25
3.18.4 Empacotamento <i>in vitro</i>	25
3.18.5 Infecção bacteriana	25
4 Resultados e Discussão	26
4.1 Clonagem de parte do gene que codifica para o transportador de íons amônio em <i>A. brasilense</i> (<i>amtB</i>)	26
4.1.1 Planejamento de oligonucleotídeos e amplificação de DNA por PCR.....	26
4.1.2 Clonagem do fragmento do gene <i>amtB</i>	34
4.2 Clonagem do gene <i>amtB</i> completo	38
4.3 Construção de uma biblioteca genômica de <i>Azospirillum brasilense</i> no fago λEMBL3.....	44
4.4 Comparação da sequência do produto de PCR clonado com o gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7	47
5 Conclusões	51
6 Referências Bibliográficas	52

LISTA DE FIGURAS

01	Regulação das atividades de NtrC e glutamina sintetase em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular	4
02	Modelo de retenção cíclica de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$	7
03	Modelo do transporte de amônio de <i>Rhizobium etli</i> para planta associada	9
04	Esquema do bacteriófago λ EMBL3	24
05	Comparação de sequências para possíveis transportadores de íons amônio	27-28
06	Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados quimicamente e utilizados como "primers" nas reações de PCR.....	30
07	Análise dos produtos de PCR obtidos com os "primers" R1/ R3	31
08	Análise dos produtos de PCR obtidos com os "primers" 4/1R e 4/2R	33
09	Esquema do vetor pTZ19R.....	35
10	Análise do plasmídeo recombinante pLFH1	36
11	Resultado da comparação da sequência obtida do produto de PCR clonado no plasmídeo pLFH1 com banco de dados a nível de proteína	37
12	Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do fragmento do gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i> com transportadores de amônio de <i>E. coli</i> , <i>M. tuberculosis</i> e <i>B. subtilis</i>	40

13	Sequência de DNA do fragmento obtido por PCR clonado	41
14	Autoradiografia da hibridização de uma das placas do banco de genes de <i>A. brasilense</i> em pLAFR3 contra o fragmento do gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i>	42
15	Comparação entre a sequência do fragmento do gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i> clonado com o gene <i>amtB</i> de <i>E. coli</i>	43
16	Análise da purificação dos “braços” do λ EMBL3 por ultracentrifugação	45
17	Análise das frações obtidas por ultracentrifugação em gradiente de sacarose do DNA total de <i>A. brasilense</i> parcialmente digerido com <i>Sau</i> 3A	46
18	Resultado da comparação da sequência do produto de PCR clonado com o gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i>	48
19	Comparação da sequência de aminoácidos deduzida do fragmento clonado com a sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i>	49

LISTA DE TABELAS

- 01 Comparação do uso de códons de *Herbaspirillum seropedicae*,
Azospirillum brasilense e *Escherichia coli* 29
- 02 Níveis de similaridade da sequência obtida do produto de PCR clonado
no plasmídeo pLFH1 com sequências depositadas no banco de dados..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS

α KG	=	α -cetoglutarato
μ g	=	micrograma
μ L	=	microlitro
[32 P] dCTP	=	α [32 P] 5' trifosfato de 2' desoxicitidina
$^{\circ}$ C	=	graus Celsius
ADP	=	5' difosfato de adenosina
Amp ^r	=	resistência a ampicilina
ATP	=	5' trifosfato de adenosina
D.O. ₆₀₀	=	densidade ótica a 600 nm
DNA	=	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	=	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
e ⁻	=	elétron
EDTA	=	ácido etilenodiamino-tetra ético
g	=	grama
GDH	=	glutamato desidrogenase
GLN	=	glutamina
GLU	=	glutamato
GOGAT	=	glutamato sintase
GS	=	glutamina sintetase
kb	=	kilobase
L	=	litro
LA	=	meio Luria agar
LB	=	meio Luria broth
m/v	=	massa por volume
mg	=	miligrama
mL	=	mililitro
N ₂ ase	=	nitrogenase
NAD ⁺	=	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	=	nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	=	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	=	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido

Nal ^r	=	resistência a ácido nalidíxico
ng	=	nanograma
OPA	=	tampão "one-phor-all"
pb	=	pares de base
PBS	=	espaço peribacterióide
PCR	=	reação em cadeia da polimerase
PEG	=	Polietileno glicol
Pi	=	fosfato inorgânico
PMB	=	membrana peribacterióide
RNA	=	ácido ribonucleico
rpm	=	rotação por minuto
SDS	=	dodecilsulfato de sódio
Sm ^r	=	resistência a estreptomicina
SSC	=	tampão citrato-NaCl
TAE	=	tampão Tris-acetato-EDTA
TB	=	meio Terrific-Broth
Tc ^r	=	resistência a tetraciclina
U	=	unidade enzimática
UMP	=	5' monofosfato de uracila

RESUMO

Azospirillum brasilense é uma bactéria capaz de fixar nitrogênio (diazotrófica) que se associa com diversas gramíneas de interesse agrícola como milho, trigo e arroz. O transporte de amônio é de fundamental interesse em bactérias diazotróficas devido a ação repressora deste íon sobre a fixação de nitrogênio. A nossa estratégia inicial para a clonagem do gene que codifica para o transportador de amônio (*amtB*) envolveu a amplificação de um pequeno fragmento deste gene por PCR, utilizando oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. Para determinar a sequência dos oligonucleotídeos a serem utilizados nas amplificações foram comparadas sequências de aminoácidos, já conhecidas, de transportadores de amônio de três organismos: *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus subtilis*. As regiões que apresentavam alta homologia foram convertidas para sequência de nucleotídeos utilizando uma tabela de preferência de códons para *A. brasilense*. O fragmento de DNA amplificado por PCR foi clonado e sequenciado (número de acesso no GenBank: AF082303). A sequência foi submetida a comparação com banco de dados e apresentou alta homologia com transportadores de íons amônio de diversos organismos. Este fragmento clonado será utilizado como sonda em hibridizações contra uma biblioteca genômica de *A. brasilense* que estamos construindo para que consigamos clonar o gene completo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Azospirillum*.

As bactérias do gênero *Azospirillum* são diazotrofos de vida livre, capazes de se associar com diversas plantas de importância agrícola como o milho, trigo, sorgo, arroz (DÖBEREINER e DAY, 1976; DÖBEREINER, 1991). São bactérias Gram negativas, curvas, móveis, com um único flagelo polar, microaerofílicas, e de várias origens geográficas. São quimio-organotróficos e oxidase positivos (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987; DÖBEREINER, 1991). A temperatura ótima de crescimento varia entre 30 e 40°C, dependendo da espécie (TRIPATHI e KLINGMÜLLER, 1992).

O gênero *Azospirillum* é uma entidade filogeneticamente separada dentro da subclasse α das Proteobactérias e comporta 6 espécies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. halopraeferans*, *A. amazonense*, *A. irakense* e *A. largomobile* (FANI *et al.*, 1995; DEKHIL *et al.*, 1997). Estas bactérias têm metabolismo tipicamente aeróbico. Em *A. brasiliense* e *A. lipoferum*, NO_3^- pode substituir o oxigênio na respiração. Nestas condições ocorrem crescimento anaeróbico e fixação de nitrogênio. As fontes de carbono preferencialmente utilizadas são ácidos orgânicos como malato, lactato, succinato e piruvato. Carboidratos como frutose e galactose também são metabolizados (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987). Estas bactérias podem realizar todos os passos do ciclo do nitrogênio, exceto a nitrificação (DÖBEREINER e PEDROSA, 1987).

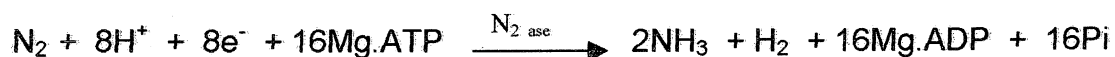
Um aumento significativo no rendimento da produção de grãos foi observado com a inoculação de *Azospirillum*, juntamente com um aumento no peso seco de fósforo, potássio e no conteúdo de nitrogênio total das plantas (OKON, 1985). O aumento na produção e crescimento após a inoculação com estirpes de *Azospirillum* tem sido atribuído principalmente a um efeito geral no crescimento das raízes e uma conseqüente melhora na capacidade de assimilação de nutrientes pela planta (KAPULNIK *et al.*, 1985). Esse efeito parece ser devido à capacidade destas bactérias de produzir fitormônios, tais como ácido indolacético, citoquininas, giberilinas e auxinas (TIEN *et al.*, 1979; de FRANCESCO *et al.*, 1985; HOREMANS e VLASSAK, 1985; MORGENSTER e OKON, 1987).

Embora não se conheçam os mecanismos envolvidos no processo de interação planta-*Azospirillum* spp., foi proposto que alguns dos passos iniciais na interação possam ser similares aos que ocorrem na interação *Rhizobium*-

leguminosa. Em *A. brasiliense* foi caracterizado um gene homólogo ao gene *nodG* de *Rhizobium meliloti*, que está envolvido no processo de nodulação (VIEILLE e ELMERICH, 1992).

1.2 A fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é o processo de redução do dinitrogênio gasoso (N_2) a amônia pelo complexo enzimático denominado nitrogenase, que catalisa a seguinte reação:



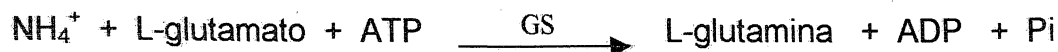
A expressão da fixação de nitrogênio em diazotrofos requer condições ambientais favoráveis. Dentre estas incluem-se ausência de nitrogênio fixado, baixas tensões de oxigênio e temperatura adequada (POSTGATE, 1982). Em vista do alto gasto energético envolvido na redução do N_2 a NH_3 , o processo de fixação de nitrogênio é altamente regulado seja a nível de atividade da nitrogenase como também a nível da expressão de seus genes (FISCHER, 1994).

O nitrogênio fixado (NH_3) e oxigênio afetam a expressão da fixação de nitrogênio nos diversos organismos diazotrofos estudados (EADY, 1986; POSTGATE, 1982). Na presença de altas concentrações de amônio, alguns microorganismos diazotróficos incluindo *A. brasiliense*, possuem um mecanismo de regulação pós-traducional é capaz de ADP-ribosilar a proteína ferro do complexo enzimático da nitrogenase reduzindo sua atividade, um processo conhecido como desligamento (switch off) da nitrogenase (ZHANG *et al.*, 1997).

De maneira simplificada, a atividade ou síntese do complexo enzimático nitrogenase só ocorre na ausência ou em níveis extremamente baixos de amônia.

1.3 Assimilação de amônia

A amônia obtida pelo processo de fixação de nitrogênio ou captada do meio externo é utilizada na síntese de glutamina e glutamato, os quais servem como doadores de nitrogênio para as reações biossintéticas. A assimilação de amônia por microrganismos pode ocorrer por duas vias, uma envolvendo a ação sequencial de glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT):



e outra envolvendo a enzima glutamato desidrogenase (GDH):



A primeira via (GS – GOGAT) é a principal responsável pela assimilação de amônia em condições limitantes deste composto. A segunda via (GDH), funciona quando a concentração de amônia é alta, pois a GDH possui uma afinidade relativamente baixa para NH_3 (PAREJKO e WILSON, 1970).

1.4 Sistema *ntr*

O sistema *ntr* controla o metabolismo geral de nitrogênio em enterobactérias regulando a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como nitrato e aminoácidos (DRUMMOND *et al.*, 1983).

Em *E. coli*, esse sistema é composto de seis proteínas: NtrB, NtrC, UTase (GlnD), P_{II} (GlnB), ATase (GlnE) e a glutamina sintetase (GS). Essas proteínas interagem em um complexo mecanismo em cascata controlado pela relação α -cetoglutarato/glutamina (BUENO *et al.*, 1985), de acordo com a figura 1.

Em baixas concentrações de amônio, onde ocorre uma baixa relação glutamina/ α -cetoglutarato, o α -cetoglutarato parece induzir uma mudança conformacional na proteína P_{II} para colocá-la em uma forma ótima para uridililação. A UTase catalisa a adição de um grupamento UMP na proteína P_{II}. Quando a P_{II} está uridililada ela não consegue se ligar a proteína NtrB que catalisa a fosforilação da proteína NtrC ativando-a. A NtrC fosforilada irá ativar a transcrição de genes envolvidos na assimilação de fontes alternativas de nitrogênio, incluindo aqueles envolvidos na fixação de nitrogênio.

A proteína P_{II} uridililada também interage com a ATase que catalisa a desadenilação da glutamina sintetase. Essa desadenilação causa ativação da glutamina sintetase a qual catalisa a formação da glutamina na presença de baixas concentrações de amônio (KEENER e KUSTU, 1988).

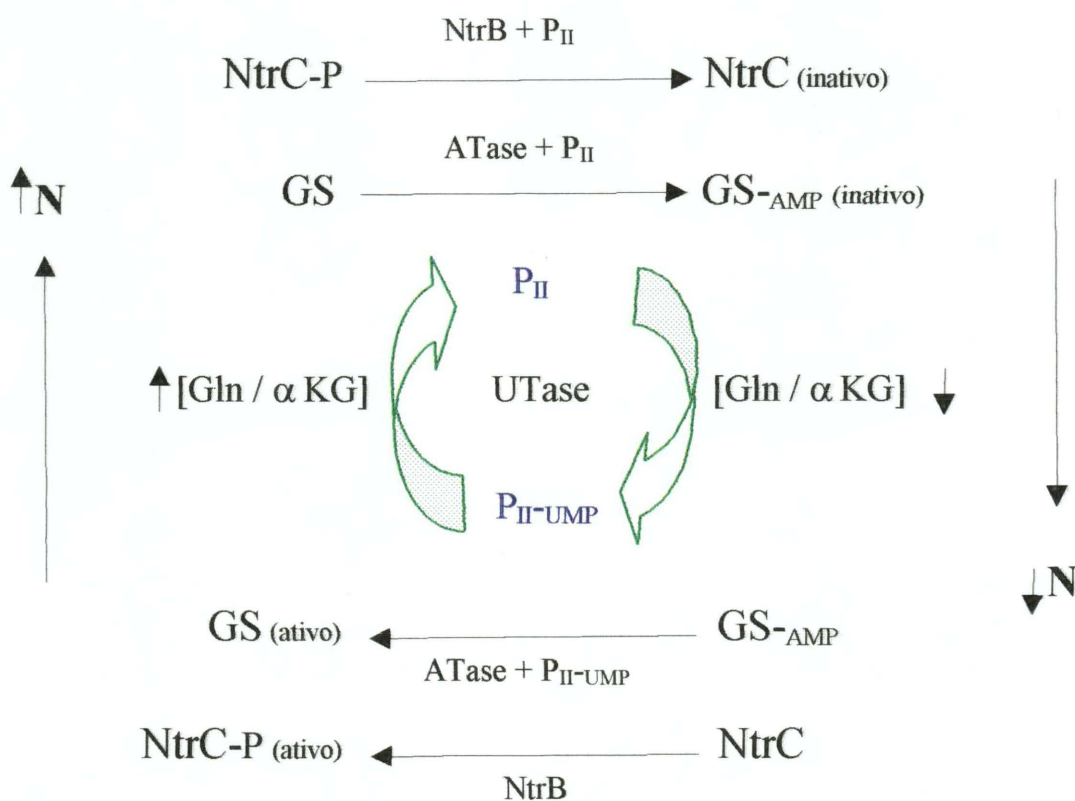


Figura 1 Regulação das atividades de NtrC e glutamina sintetase (GS) em resposta aos níveis de nitrogênio intracelular (HOLTEL e MERRICK, 1989 adaptado por MACHADO *et al.*, 1995).

Em condições de altos níveis de nitrogênio fixado, a UTase se liga a glutamina o que inibe a reação de uridililação e favorece a desuridililação da P_{II} (de MEL *et al.*, 1994). Quando a P_{II} está desuridililada, ela se liga a proteína NtrB a qual desfosforila NtrC, inativando-a. A P_{II} desuridililada também age sobre a ATase a qual catalisa a adenilação da glutamina sintetase, inativando-a (HAWKES *et al.*, 1985).

Em *A. brasilense* uma proteína paróloga a P_{II} , denominada Pz (produto do gene *glnZ*), foi identificada (de ZAMAROCZY, 1998). Apesar da alta homologia entre Pz e P_{II} (66% de identidade e 82% de similaridade), estas proteínas parecem ter diferentes papéis na regulação da fixação de nitrogênio. A proteína Pz pode estar relacionada com o transportador de íons amônio, já que mutantes *glnZ* exibem taxa de transporte de amônio maior que a estirpe selvagem e, quando *glnZ* é superexpresso em *A. brasilense*, a taxa de transporte de amônio diminui (de ZAMAROCZY, 1998).

1.5 Transporte de amônia

A amônia é o composto nitrogenado de mais fácil utilização em procariotos e aquele que proporciona a maior velocidade de crescimento se comparado a outras fontes nitrogenadas. Entretanto, em várias situações, a bactéria é obrigada a utilizar outras fontes de nitrogênio e, neste caso, esses organismos sintetizam proteínas visando a captação e metabolização destes compostos. A síntese e, em alguns casos, a atividade dessas proteínas são altamente reguladas em relação a disponibilidade desses compostos (MERRICK e EDWARDS, 1995).

O transporte de amônia através da membrana celular pode ocorrer por duas vias: a primeira, um transporte passivo, envolveria a simples difusão da amônia em sua forma neutra através da membrana celular. A segunda via ocorreria com a molécula protonada, na forma do íon amônio (NH_4^+), sendo aparentemente dependente de alguma forma de energia (KLEINER, 1981) já que a difusão de moléculas carregadas através da membrana é dificultada.

Evidências sobre a existência de transportadores ativos de íons amônio em procariotos são descritas em cerca de 50 espécies (MERRICK e EDWARDS, 1995), inclusive em *A. brasilense* (HARTMANN e KLEINER, 1982). Esses transportadores foram denominados genericamente por Amt.

A análise das proteínas codificadas pelos genes *amt* já clonados, indicam caráter transmembrânico e alta homologia (MERRICK e EDWARDS, 1995). Porém,

recentemente foi descrita uma proteína, formadora de um canal iônico para NH_4^+ na membrana peribacteriódica da soja, que apresenta propriedades únicas e não possui homologia com outras proteínas Amt conhecidas (KAISER *et al.*, 1998).

O acúmulo de NH_4^+ intracelular tem sido observado em procariotos e é uma das evidências da existência de transportadores ativos de NH_4^+ . Devido a ocorrência de pH alcalino (em relação ao meio externo) no citoplasma da maioria das bactérias, a amônia acumulada prevaleceria na forma neutra (NH_3) e seria perdida por difusão até atingir o equilíbrio com o meio externo (KLEINER, 1981). Segundo esta teoria, o transportador de NH_4^+ não impediria a perda de NH_3 por difusão, mas estaria constantemente recuperando-a, após sua protonação. A diminuição do potencial de membrana resultante do transporte de NH_4^+ seria balanceado por uma exportação de prótons dependente de energia como mostra o esquema da figura 2.

Recentemente, entretanto, uma outra hipótese foi sugerida onde as proteínas Amt poderiam ser responsáveis pela formação de um canal para NH_3 na membrana plasmática (SOUPENE *et al.*, 1998) essa hipótese é sustentada pelos seguintes fatos: em *E. coli* só é observada deficiência de crescimento de mutantes *amtB* em pH abaixo de 7, indicando que a função da AmtB só é requerida para o crescimento de *E. coli* quando a concentração de NH_3 externa cai para 50nmols/L ou menos (o que equivale a 1mmol/L de $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$ em pH 5 e 10 μ mols/L em pH 7). Também foi demonstrado que em pH 7 a expressão constitutiva do AmtB não normalizou o crescimento de um mutante GS^- (sem atividade de glutamina sintetase) de *Salmonella typhimurium*. Esta deficiência no crescimento parece ser causada pela necessidade de uma alta concentração interna de NH_4^+ , requerida para assimilação de amônia via GDH, indicando que a AmtB não concentra este íon (SOUPENE *et al.*, 1998).

Em *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Azorhizobium caulinodans* e *Rhizobium etli* o gene que codifica para o transportador de amônio (*amtB*) é co-transcrito com o gene *glnK* (que codifica para a proteína GlnK) e é expresso apenas em situações limitantes de nitrogênio a partir de um promotor dependente da subunidade sigma-54 da RNA polimerase e da proteína ativadora NtrC (MICHEL-REYDELLET e KAMINSKI, 1999). Em *Azotobacter vinelandii* o gene *amtB* também é co-transcrito com *glnK* porém, na sua região promotora foi identificado apenas um sítio de ligação para a subunidade sigma-70 da RNA polimerase (MELETZUS *et al.*, 1998). Mutações sítio-dirigida do gene *amtB* em *Azotobacter vinelandii* e *Azorhizobium caulinodans* provocaram uma

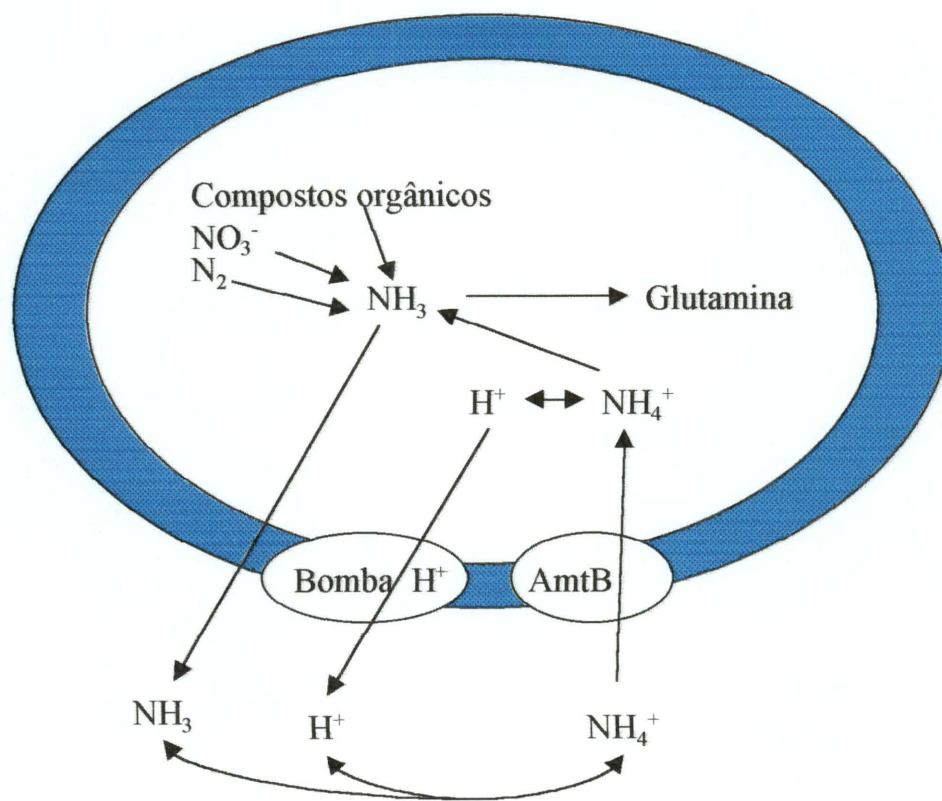


Figura 2 – Modelo de retenção cíclica de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (KLEINER, 1981)

deficiência no transporte de metilamônio, no entanto, o crescimento em baixas concentrações de amônio não foi alterado (MELETZUS *et al.*, 1998; MICHEL-REYDELLET e KAMINSKI, 1999), sugerindo a presença de um outro sistema envolvido no transporte de amônio nestes organismos. A presença de um segundo transportador de íons amônio, denominado AmtY, foi descrito recentemente em *Azoarcus sp.* e *Rhodobacter capsulatus* (YAKUNIN e HALLENBECK, 1999; MARTIN e REINHOLD-HUREK, 1999). Múltiplos sistemas de transporte de amônio também foram descritas em plantas e fungos (NINNEMANN *et al.*, 1994; MARINI *et al.*, 1994).

Em *Rhodobacter capsulatus* mutações sítio-dirigidas os genes *amtB* e *amtY* foram obtidas e ambos os mutantes apresentaram taxas de captação de amônio semelhantes a estirpe selvagem, porém o mutante *amtB*⁻ mostrou deficiência no transporte de metilamônio (YAKUNIN e HALLENBECK, 1999). O mutante *amtB*⁻ também é incapaz de ADP-ribosilar a proteína ferro do complexo da nitrogenase na presença de amônio (YAKUNIN e HALLENBECK, 1999). Este resultado sugere que mutantes *amtB*⁻ sejam capazes de manter o funcionamento do sistema de fixação de nitrogênio em concentrações de amônio mais elevadas se comparados com a estirpe selvagem.

Recentemente foi proposto um modelo de regulação entre o transporte de amônio e a fixação de nitrogênio no diazotrofo associativo *Rhizobium etli* (TATÉ *et al.*, 1999). Quando a bactéria está livre no solo ela estaria expressando o gene *amtB*, ao infectar uma leguminosa, acredita-se que um mecanismo envolvendo a degradação da proteína NtrC, seja responsável pela repressão da transcrição do gene *amtB*. A repressão do sistema de transporte de amônio e um bloqueio da glutamina sintetase, em condições de fixação de nitrogênio, permitiriam a excreção de amônio da bactéria para a planta associada (figura 3). Em *Rhizobium etli* foi também observado que a expressão constitutiva do gene *amtB* afeta o processo de nodulação e de fixação de nitrogênio nos bacterióides (TATÉ *et al.*, 1999).

A clonagem e sequenciamento do gene *amt* de *A. brasilense* FP2 permitiria não só apenas o conhecimento de sua regulação transcricional, mas também poderia permitir o isolamento de mutantes de *A. brasilense* deficientes em transporte ativo de amônio, esses mutantes, num primeiro aspecto, manteriam o sistema de fixação de nitrogênio em concentrações mais elevadas de amônia extracelular (na bactéria selvagem, a adição de amônia ao meio de cultura leva a uma acentuada

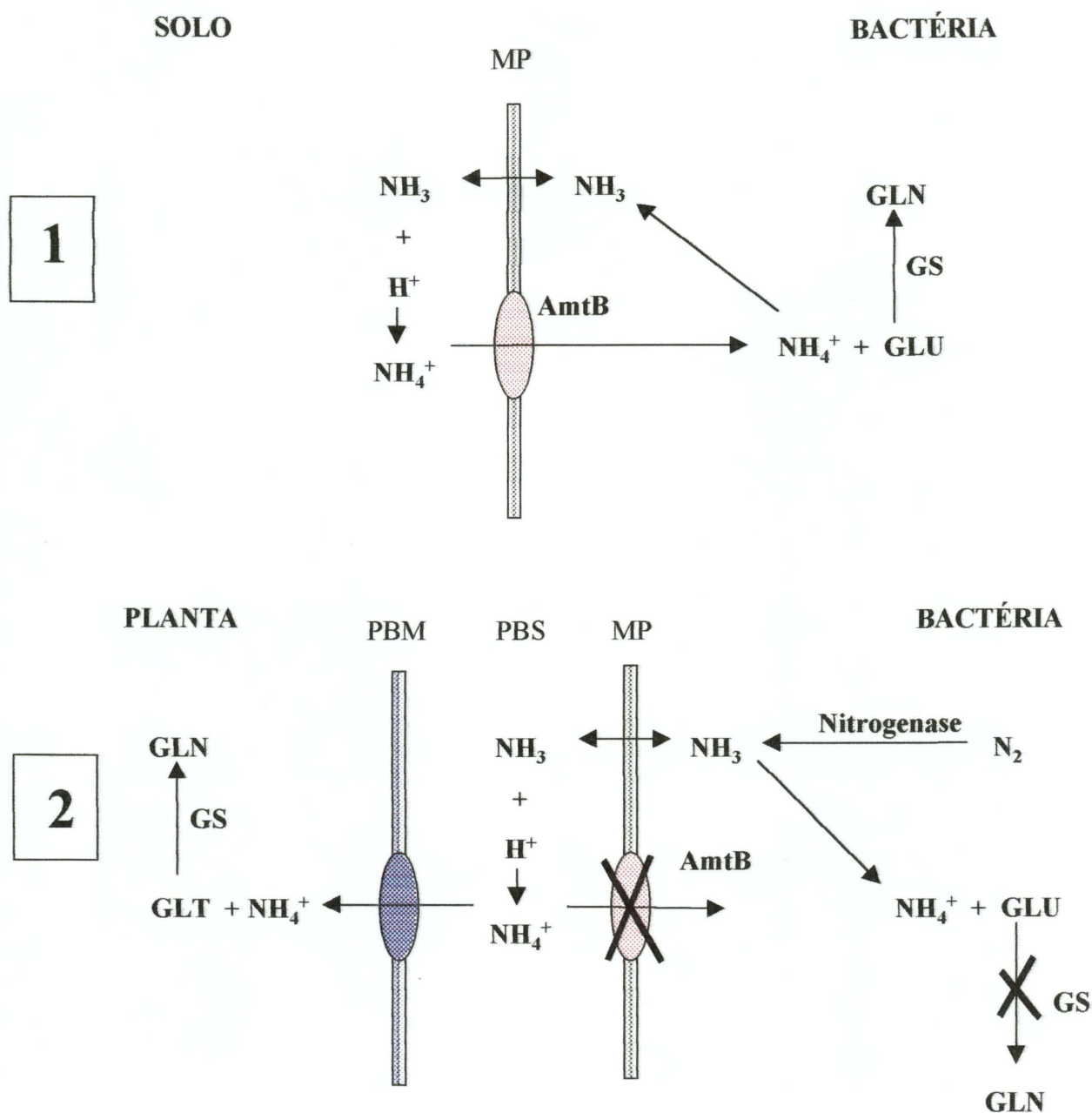


Figura 3 - Modelo do transporte de amônio de *Rhizobium etli* para planta associada (adaptado de TATÉ *et al.*, 1999).

1 - representação da bactéria antes de infecção, 2 - representação após infecção da planta. (GLN) indica glutamina, (GLU) glutamato, (PMB) membrana peribacterióide, (PBS) espaço peribacterióide e (GS) glutamina sintetase.

diminuição na atividade e síntese da nitrogenase). Outro aspecto desses mutantes deficientes em transporte de amônio, seria uma maior dificuldade em recaptar a amônia obtida pelo processo de fixação e que teria sido eliminada pelo processo de difusão. Neste ponto, vale salientar que a amônia produzida pelo processo de fixação de nitrogênio e não utilizada pelo sistema bacteriano, poderia sofrer difusão para o exterior deste microrganismo, permitindo a sua utilização pela planta associada. Estes aspectos são extremamente interessantes, na medida que *A. brasilense* é capaz de associar-se a diversos vegetais de interesse agrícola. Assim, mutantes de *A. brasilense* deficientes no transporte de amônio, poderiam atuar em determinadas situações como biofertilizantes, podendo trazer benefícios não só com a redução de custos na produção agrícola como certamente reduziria o impacto de fertilizantes nitrogenados no meio ambiente, diminuindo a poluição ambiental causada pelo nitrato e seus metabólitos de redução (NO_2^- , NO e N_2O).

2. OBJETIVO

- Clonar, sequenciar e caracterizar as regiões codificadoras para transportadores de íons amônio de *A. brasilense*;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Bactérias, plasmídeos e bacteriófagos

Organismo ou plasmídeo	Propriedades	Referência ou Fonte
<i>A. brasilense</i>		
FP2	Estirpe selvagem, SP7 Nif ⁺ Nal ^r Sm ^r	Pedrosa e Yates, 1984
<i>E. coli</i>		
XL1Blue	Tc ^r ; F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
LE392	<i>SupE supF hsiR</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
71-18	F' [<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15]	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
HB101	<i>recA Sm supE I</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Plasmídeos		
pTZ19R	Cb <i>lacZ</i> f1 IG Amp ^r	Mead <i>et al.</i> , 1986
pLFH1	Amp ^r ; pTZ19R + parte do gene <i>amtB</i> de <i>A. brasilense</i>	Este trabalho
pLAFR3	λcos <i>lacZ</i> , <i>mob</i> ⁺	Staskavicz <i>et al.</i> , 1987
Bacteriófago		
λEMBL3		Sambrook <i>et al.</i> , 1989

3.2. Meios de cultura

O meio de cultura utilizado para o cultivo de *A. brasilense* FP2 foi o meio NFbHP (MACHADO *et al.*, 1991) que apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
KH_2PO_4	4,0
K_2HPO_4	6,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-1}$
NaCl	$1,0 \cdot 10^{-1}$
CaCl_2	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Ácido nitrilo triacético	$5,6 \cdot 10^{-2}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Lactato de sódio	5,0
Biotina	$1,0 \cdot 10^{-4}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$2,35 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$2,8 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$

Como fonte de nitrogênio foi utilizado NH_4Cl 20mmol/L. As soluções de fosfatos e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio no momento de uso. Quando completo, o meio de cultura apresentou pH 6,8 e passou a ser denominado NFbHPN.

Os meios de cultura líquidos utilizados no cultivo das estirpes de *Escherichia coli* foram Luria-Broth (LB) e Terrific-Broth (TB) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

O meio LB apresenta a seguinte composição:

	gramas/litro
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	10,0
Triptona	10,0

O meio sólido foi obtido a partir da adição de ágar na concentração de 15g/L ao meio líquido e foi denominado LA.

O meio TB apresenta a seguinte composição:

Extrato de levedura	24,0 g/L
Triptona	12,0 g/L
glicerol	4,0 mL/L
KH ₂ PO ₄	2,31g/L
K ₂ HPO ₄	12,54g/L

A estirpe de *E. coli* LE392 (hospedeira para o bacteriófago λ EMBL3) foi cultivada em meio líquido NCZYN que apresenta a seguinte composição:

	gramas/Litro
NZ amina	10
NaCl	5
Extrato de levedura	5
Casaminoácidos	1
MaSO ₄ .7H ₂ O	2

Para diferenciação das estirpes de *E. coli lac*⁺ e *lac*⁻, as células foram cultivadas em meio MacConkey que possui indicadores de pH. Este meio apresenta a seguinte composição:

	gramas/Litro
Peptona	17
Poliipeptona	3
Lactose	10
Sais biliares	1,5
NaCl	5
Ágar	13,5
Vermelho neutro	0,03
Cristal violeta	0,001

3.3 Condições de cultivo

Azospirillum brasilense foi cultivado em meio líquido NFbHPN a 30°C sob agitação (130 rpm).

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido LB, TB ou NCZYM a 37°C sob agitação (130 rpm).

Para o cultivo de *E. coli* em meio sólido foram utilizados os meios LA ou Mac Conkey, em placas de Petri contendo os antibióticos adequados. As culturas foram mantidas a 37°C.

Para o cultivo de bactérias em meio líquido foi sempre mantida a relação de 1/5 do volume da cultura para o volume total do frasco utilizado para aeração durante o crescimento.

Estoques das estirpes de *E. coli* e *A. brasilense* foram preparados centrifugando-se 1mL de cultura saturada por 1 minuto a 13.000rpm, o pellet obtido foi ressuspenso em 1mL de glicerol 50% e mantido a -20°C.

3.4 Antibióticos

Os antibióticos e suas concentrações de uso foram:

	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ácido nalidíxico (Nal)	10	10
Ampicilina (Amp)	200	200
Tetraciclina (Tc)	10	10
Estreptomicina (Sm)	50	50

A solução estoque de tetraciclina foi preparada em etanol e armazenada na ausência de luz a -20°C, as demais soluções estoque de antibióticos foram preparadas em água destilada autoclavada, esterilizadas por filtração e mantidas a -20°C.

3.5 Extração do DNA total de *Azospirillum brasilense*

Cem microlitros de uma cultura fresca de *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 (selvagem) foram inoculadas em 5mL de meio líquido NFbHPN contendo estreptomicina e ácido nalidíxico, incubado a 30°C sob agitação por 18 horas. A cultura foi transferida para tubos plástico tipo Ependorff e centrifugadas a 13.000rpm por 1 minuto. O pellet foi lavado com 1mL de tampão TES (Tris-HCl pH 8,0 50mmol/L, EDTA pH 8,0 20mmol/L, NaCl 200mmol/L) e ressuspenso em 500µL de TES. Lisozima foi adicionada a suspensão celular para concentração final de 100µg/mL e a mistura incubada a 30°C por 1 hora.

Foram adicionados SDS (1% m/v) e proteinase K (50µg/mL), a mistura foi homogeneizada e incubada a 30°C por 16 horas.

A solução de DNA foi purificada com quatro extrações com 500µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e duas extrações com clorofórmio. Após as extrações, foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto para a precipitação do DNA e a mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos. O pellet obtido foi lavado com 500µL de etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 80µL de água. A solução de DNA foi tratada com RNase na concentração final de 100µg/mL durante 2 horas a 37°C e armazenada a -20°C.

3.6 Amplificação de DNA por PCR

A amplificação do fragmento do gene que codifica para o transportador de amônio foi feita utilizando o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER e WILSON, 1991). Os "primers" utilizados foram oligonucleotídeos sintetizados quimicamente utilizando fosforamidites em um Gene Assembler (Pharmacia).

Para a reação de amplificação foram utilizados tampão de PCR (20mmol/L Tris-HCl pH 8,4 e 50mmol/L KCl), 0,2mmol/L dNTPs, 10pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5mmol/L MgCl₂, 20ng de DNA total de *Azospirillum brasilense* e 2U de *Taq* DNA polimerase em um volume final de reação de 50µL. Foram testados vários parâmetros para os ciclos de amplificação.

3.7 Extração de plasmídeo

A extração de plasmídeos foi feita pelo método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um mililitro de cultura, crescida durante a noite, foi centrifugada a 13.000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente. O sedimento de células foi ressuspenso em 100µL de GET (50mmol/L glicose, 25mmol/L Tris-HCl pH 8,0 e 10mmol/L de EDTA pH 8,0) e a lise efetuada com a adição de 200µL de uma solução de SDS 1% e NaOH 0,2mol/L. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com a adição de 200µL de acetato de potássio 3mol/L pH 4,8 e incubados por 10 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas a 13.000rpm por 5 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 0,6 do volume de isopropanol, mantendo-se a mistura a -20°C por 20 minutos com a finalidade de precipitar o DNA

plasmidial. A mistura foi centrifugada a 13000rpm por 10 minutos, o precipitado foi lavado com 2mL de etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 200μL de água. Foram adicionados 2μL RNase (10mg/mL) e a amostra foi incubada a 37°C por 50 minutos. Foram realizadas extrações seguidas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio. O DNA plasmidial foi precipitado acrescentando-se 1mL de etanol absoluto à fase aquosa, mantendo-se por 20 minutos a -20°C, a mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 200μL de água.

3.8 Clivagem de DNA com endonucleases de restrição

As endonucleases de restrição foram utilizadas nas condições de ensaio especificadas pelos fabricantes (GibcoBRL, Pharmacia Biotech e Boehringer Mannheim Biochemicals). Em um sistema de 20μL foi utilizado: tampão de restrição (fornecido pelo fabricante) na concentração adequada, aproximadamente 0,5μg de DNA, 3U de enzima de restrição e água para 20μL. Este sistema foi incubado por 3-5 horas a 37°C.

Para a inativação da enzima a solução foi incubada a temperatura de 65°C por 20 minutos e posteriormente extraída com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA da fase aquosa foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto, centrifugado, lavado com 200μL de etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 10μL de água.

3.9 Desfosforilação de plasmídeos

A desfosforilação de plasmídeos foi feita adicionando-se fosfatase alcalina de bezerro (CAP 0,7U) à reação de restrição. Após a incubação foram adicionados 15μL de SDS 10%, 3μL de EDTA 0,5mol/L e 1μL de proteinase K (20mg/mL), seguido de incubação a 50°C por mais 1 hora com a finalidade de degradar a CAP. Foram realizadas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e com clorofórmio. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e centrifugação a 13.000rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e dissolvido em 10μL de água.

3.10 Ligação de DNA

O DNA plasmidial linearizado foi reunido ao DNA inserto na proporção de 0,05:0,5µg, a solução foi aquecida a 65°C por 5 minutos e resfriado em banho de gelo. Tampão de ligação foi adicionado ao sistema junto com 0,5U de DNA ligase. O sistema foi incubado a 8°C por 12 horas.

3.11 Preparação de bactérias *E. coli* competentes para eletroporação

Duzentos e cinquenta mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1:100, com um pré-inóculo. A cultura foi então incubada a 30°C sob agitação até atingir D.O.₆₀₀ (densidade óptica no comprimento de onda de 600nm) aproximadamente igual a 0,5. A cultura foi transferida para tubos estéreis e centrifugada a 5.000rpm a 4°C por 5 minutos. O sedimento de células foi lavado sequencialmente com 250 e 150mL de água estéril, seguido de lavagem com 5 mL de glicerol 10%(m/v). O sedimento foi ressuspensão em 0,5mL de glicerol 10% e a solução fracionada em alíquotas de 40µL e armazenadas a -70°C por até 6 meses.

3.12 Transformação bacteriana por eletroporação

Para transformação de *E. coli*, 1µL da mistura da ligação foi adicionada a 40µL da suspensão de células eletrocompetentes e a mistura incubada no gelo por 1 minuto. Essas células foram transferidas para um cubeta de eletroporação e submetidas a um campo elétrico de 400DC volts a fim de permitir a entrada do plasmídeo na célula segundo procedimento recomendado pelo fabricante (GibcoBRL).

Após a eletroporação, as células foram ressuspensas em 1mL de meio LB, transferidas para frascos de cultura e incubadas a 37°C sob agitação durante 1 hora. Alíquotas deste material foram plaqueadas em meio adequado a fim de selecionar os transformantes de interesse.

3.13 Análise de plasmídeos recombinantes

As colônias de interesse (selecionadas pelo meio de cultura) foram inoculadas em meio LB contendo o antibiótico adequado e, após crescimento, foi realizada extração plasmidial (item 3.8).

A verificação da ligação vetor-fragmento foi feita através da digestão do DNA

com enzimas de restrição apropriadas. O resultado foi analisado por eletroforese do DNA digerido.

3.14 Sequenciamento automático de DNA

O sequenciamento automático de DNA foi realizado pelo método de dideoxirribonucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977). Foi utilizado um Sequenciador Automático de DNA da Applied Biosystems (Perkin-Elmer) que utiliza quatro cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia, eletroforese em coluna capilar e detecção a Laser. As seqüências obtidas foram transferidas eletronicamente ao microcomputador e analisadas em vários programas.

3.14.1 Preparação do material para sequenciamento

Para a adição dos cromóforos fluorescentes como terminadores de cadeia (dideoxirribonucleotídeos), o DNA a ser sequenciado foi submetido a uma reação de polimerização utilizando "kit" de sequenciamento da Perkin-Elmer. Ao DNA plasmidial purificado (0,5-1,0µg) foram acrescentados: 1µL de "primer" (10 pmol) e 6,0µL de mistura para sequenciamento Terminator Ready Mix (Perkin-Elmer). Esta solução então foi submetida a uma reação no termociclador que consistia dos seguintes passos: 1 ciclo: 95°C-5 min, seguido de 30 ciclos de 96°C-30 seg, 40°C-30 seg e 65°C-6 min. A purificação dos produtos da reação foi realizada segundo recomendação do fornecedor do "kit" de sequenciamento. Após a purificação as amostras foram aplicadas no sequenciador automático.

3.15 Separação eletroforética de DNA

A eletroforese de DNA foi feita em gel de agarose horizontal ou em gel de poliacrilamida vertical como descrito por SAMBROOK *et al* (1989), dependendo do tamanho do fragmento de DNA a ser utilizado.

Os géis de agarose foram preparados em tampão TAE (Tris-acetato 40mmol/L e EDTA 1mmol/L pH 8,0). A concentração de agarose variou de 0,7% a 1,5%, dependendo do tamanho do DNA a ser analisado. Os géis de poliacrilamida 12% foram preparados em tampão TAE e utilizados quando os fragmentos de DNA analisados eram menores que 500pb. O DNA foi visualizado em transluminador de luz ultravioleta após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5mg/mL), o

perfil eletroforético foi registrado fotograficamente (SAMBROOK *et al.*, 1989) ou utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplada a equipamento de impressão a seco (GDS 5000).

3.16 Purificação de DNA em gel de agarose

Para purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose, a eletroforese foi conduzida em agarose de baixo ponto de fusão em tampão TAE 1X. Após visualização, as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram cortadas, separadas em tubos eppendorf e incubadas a 65°C por 5 minutos para a fusão da agarose. Foram adicionados: Tris-HCl pH 8,0 (50mmol/L), NaCl (200mmol/L) e 1 volume de fenol pH 8,0. A mistura foi agitada e centrifugada a 13.000rpm por 5 minutos. Ao sobrenadante acrescentou-se 0,6 volumes de isopropanol, a mistura foi incubada a -20°C por 20 minutos sendo então centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos. O pellet foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em água.

3.17 Isolamento do gene *amtB* utilizando o banco de genes de *A. brasilense* no cosmídeo pLAFR3

3.17.1 Crescimento de alíquotas do banco de genes

Oito alíquotas do banco de genes de *A. brasilense* FP2, construído no cosmídeo vetor pLAFR3 e mantido em *E. coli* HB101 (SOUZA, E. M.; dados não publicados), foram crescidas (em diferentes frascos) em meio LB até D.O_{600nm} = 1. As culturas foram diluídas 10⁻⁵ X, e 200µL dessas diluições foram semeados em meio sólido LA. Após incubação por 24 horas a 37°C, as placas apresentavam aproximadamente 200 colônias isoladas.

3.17.2 Transferência do DNA do banco de genes para membranas de nylon

O método utilizado foi o descrito pelo fabricante da membrana (Amersham). As membranas foram colocadas sobre a superfície do ágar contendo as colônias (item 3.17.1) e deixada por 1 minuto. Marcou-se a membrana e o ágar com uma agulha, para permitir a correta orientação nas placas. A membrana foi tratada com solução de lise (1,5 mol/L NaCl e 0,5 mol/L NaOH) por 5 minutos, neutralizante (1,5 mol/L NaCl, 0,5 mol/L Tris-HCl pH 7,2 e 0,001 mol/L EDTA) por 5 minutos e com

uma solução 20X SSC (3 mol/L NaCl e 0,3 mol/L de citrato de sódio) por 2 minutos. Esses tratamentos foram realizados sobre papel filtro embebido com as soluções. Após secagem ao ar, o DNA foi fixado à membrana de nylon por irradiação com luz ultravioleta em transiluminador durante 4 minutos.

3.17.3 Hibridização de DNA

As membranas contendo DNA foram pré-hibridizadas em tampão de Tris-HCl 50 mmol/L pH 7,5 contendo SDS 5% por 15 minutos a 65 °C e hibridizadas na mesma solução contendo a sonda a 65°C, durante aproximadamente 24 horas. As membranas foram lavadas com SSC variando de 2X a 0,1X, SDS 0,1% a 65°C, por 30 minutos e expostas contra um filme de raios-X.

A sonda foi o fragmento do gene *amtB* de *A. brasilense* retirado do plasmídeo pLFH1 após digestão com a enzima de restrição *SaI* I e separação em eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão. A sonda foi marcada com [α 32 P]dCTP usando o sistema Megaprimer DNA Labelling (Amersham), conforme a recomendação do fabricante. A manipulação da sonda radioativa foi conduzida pela Ms. Fabiane Rego (Departamento de Bioquímica – UFPR)

3.18 Construção de uma biblioteca genômica de *Azospirillum brasilense* no fago λ EMBL3

3.18.1 Preparo do DNA genômico de *Azospirillum brasilense*

O DNA total de *Azospirillum brasilense* foi purificado seguindo o procedimento descrito no item 3.5. Cerca de 10 μ g do DNA purificado foram parcialmente digeridos com 1U de *Sau* 3A em tampão OPA 1,5X (Pharmacia). A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Após este período foi adicionado 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a mistura foi agitada e centrifugada 13.000rpm por 10 minutos. À fase aquosa foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto seguido de nova centrifugação (13.000rpm por 10 minutos), o pellet obtido foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspensão em 300 μ L de água.

Para se separar apenas fragmentos de DNA com um tamanho ideal para o empacotamento no fago λ EMBL3, todo o DNA cortado com a enzima *Sau* 3A foi submetido a ultracentrifugação (26.000rpm por 24 horas a 16°C) em um gradiente de

sacarose de 10 a 40% preparado no tampão NaCl 1mol/L, Tris-HCl 20mmol/L pH 8,5, EDTA 5mmol/L. Terminada a ultracentrifugação, o gradiente foi fracionado em alíquotas de 200 μ L. Uma a cada três alíquotas foram analisadas em gel de agarose 0,7% para se localizar as fração com maior proporção de DNA com tamanho ideal para o empacotamento no fago λ EMBL3 (cerca de 14kb). As frações que continham alta concentração de DNA com taxa de migração próxima de 14kb foram agrupadas e tratadas com 2 volumes de etanol absoluto, a mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos, o pellet obtido foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 5 μ L.

3.18.2 Purificação dos braços do λ EMBL3

A purificação dos braços do λ EMBL3 foi realizada segundo SAMBROOK *et al* (1989). 200mL de bactérias hospedeiras *E. coli* estirpe LE392 foram crescidas em meio NCZYM a 37°C, até D.O_{600nm} aproximada de 0,5. A esta cultura foram adicionados MgCl₂ (10mmol/L) e 1,5mL de uma suspensão de fago λ EMBL3. A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos sem agitação para que as partículas virais se aderissem as células. Passado este tempo, a cultura foi mantida a 37°C sob agitação durante a noite. Após 18 horas foram adicionados 5mL de clorofórmio, e a cultura foi mantida a 37°C (sob agitação) por 30 minutos. A suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos a 6.000rpm. O sobrenadante foi transferido para um frasco contendo 11,6g de NaCl (concentração final 1mol/L), após totalmente dissolvido o sal, a solução foi mantida no gelo por 1 hora e centrifugada por 10 minutos a 6.000rpm. O sobrenadante foi transferido para um frasco contendo 20g de PEG (polietilenoglicol) 8000 (concentração final 10%). A suspensão foi mantida no gelo por 4 horas e centrifugada a 10.000rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 3mL de SM (NaCl 5,8g/L, MgSO₄.7H₂O 2g/L, Tris-Cl 50mmol/L pH 8,5, gelatina 0,01%). A suspensão foi extraída com 1 volume de clorofórmio e a fase aquosa (suspensão de partículas virais) foi armazenada.

A suspensão contendo as partículas virais foi submetida a uma ultracentrifugação (22.000rpm por 2 horas a 20°C) em gradiente de cloreto de cério como descrito por SAMBROOK *et al* (1989). Terminada a ultracentrifugação, a banda que continha as partículas virais foi retirada e dialisada segundo SAMBROOK *et al* (1989) para retirar o excesso de cloreto de cério.

Para se extrair o DNA do λ EMBL3 foram adicionados, a suspensão previamente dialisada, SDS para concentração final de 1%, EDTA (50mmol/L) e proteinase k (50 μ g/mL). A mistura foi incubada a 50°C por 2 horas. Foram realizadas extrações seguidas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio. O DNA foi precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto, acetato de amônio 0,5mol/L e incubação por 30 minutos a -20°C. A mistura foi então centrifugada (13.000rpm por 10 minutos), o pellet foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 300 μ L de água.

Todo o DNA obtido foi totalmente digerido com 2U da enzima de restrição *Bam* HI em um sistema de 2mL em tampão OPA 2X concentrado. A reação foi incubada a 37°C por 16 horas. Com esta digestão, ocorre a quebra do DNA viral em dois pontos produzindo 3 fragmentos, sendo dois com aproximadamente 20 e 9kb ("braços" do λ) e um fragmento de aproximadamente 14kb ("central stuffer") figura 4. O DNA cortado foi precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto e, após 20 minutos a -20°C, a solução foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos. O pellet obtido foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 500 μ L de água.

Para a purificação do "braços" foi realizada uma ultracentrifugação em gradiente de sacarose como descrito no item 3.18.1. Para isso, a amostra contendo o DNA foi incubada por uma hora a 42°C na presença de 10mmol/L de MgCl₂. Durante este período os sítios cos presentes nos fragmentos de 9 e 20kb se pareiam formando um fragmento maior que pode ser mais facilmente separado do fragmento de 14kb no gradiente de sacarose.

Terminada a ultracentrifugação, o gradiente foi fracionado em alíquotas de 200 μ L. Uma a cada três alíquotas foram analisadas em gel de agarose 0,7% para se localizar em quais frações estavam presentes os fragmentos de 9 e 20kb com menor contaminação do "stuffer". As frações menos contaminadas foram agrupadas e tratadas com 2 volumes de etanol absoluto, a mistura foi centrifugada a 13.000rpm por 10 minutos, o pellet obtido foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 5 μ L.

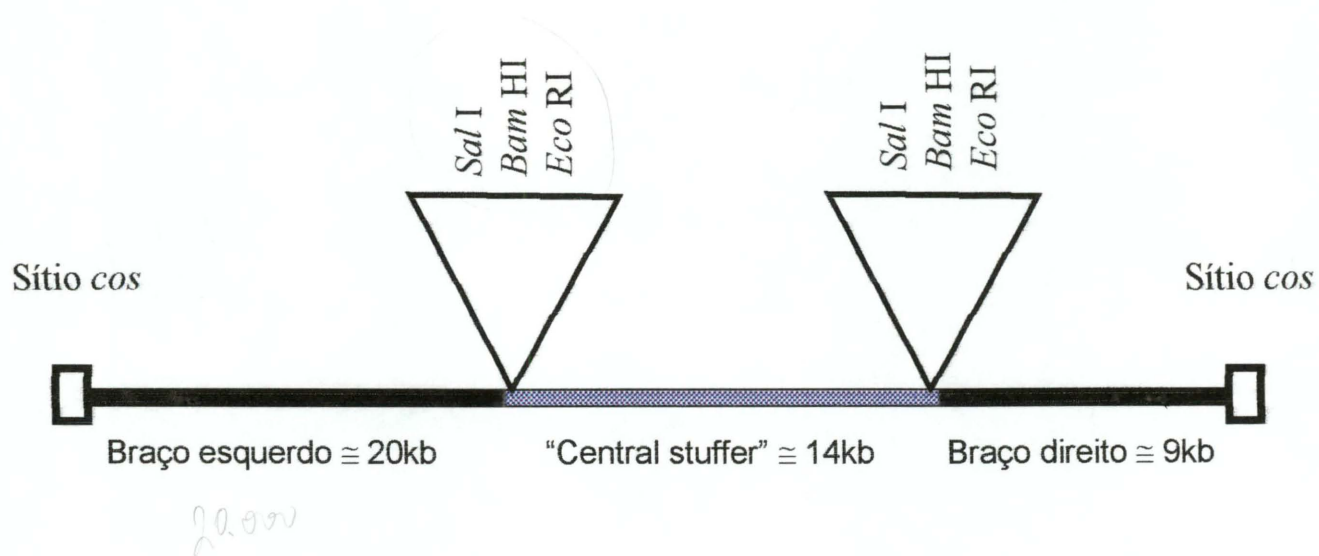


Figura 4 - Esquema do bacteriófago λEMBL3 (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.18.3 Ligação dos braços do λ EMBL3 com o DNA total de *A. brasilense* FP2 cortado

Para a ligação foram utilizados aproximadamente 0,2 μ g da purificação dos braços (item 3.18.2) e 1 μ g do DNA de *A. brasilense* cortado (item 3.18.1). A mistura foi aquecida a 65°C e, após resfriamento em banho de gelo, foram adicionados 2 μ L de tampão de ligação 5X concentrado sem polietilenoglicol (Gibco-BRL) e 1U de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C durante a noite. O DNA foi precipitado com a adição de 3 volumes de etanol absoluto e centrifugação a 13.000rpm por 10 minutos. O pellet foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspenso em 4 μ L de água.

3.18.4 Empacotamento *in vitro*

Toda a reação de ligação (item 3.18.3) foi utilizado na reação de empacotamento *in vitro* utilizando uma mistura de empacotamento para fago λ (λ "packing kit") da Pharmacia seguindo as especificações do fabricante.

3.18.5 Infecção bacteriana

Bactérias *E. coli* estirpe LE392 foram crescidas em meio NCZYM (50mL) suplementado com 0,2% de maltose até D.O_{600 nm} aproximada de 0,5. A cultura foi centrifugada (5.000rpm por 5 minutos), o sedimento de células foi ressuspenso em 5mL de MgSO₄ 10mmols/L e armazenado a 4°C por até 14 dias .

Trinta microlitros da mistura de empacotamento *in vitro* (item 3.18.4), foram misturadas com 100 μ L de bactéria LE392 em MgSO₄ e 200 μ L de SM. A suspensão foi incubada a 37°C por 30 minutos para que as partículas virais se aderissem as células. Esta mistura foi então homogenizada com 4mL de top ágar (LA 50%, LB 50%) fundido e a solução espalhada sobre 15mL de meio LA já solidificado em placa de Petri. A cultura foi incubada a 37°C por 16 horas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clonagem de parte do gene que codifica para o transportador de íons amônio em *A. brasilense* (*amtB*)

A nossa estratégia utilizada para clonagem do gene que codifica para o transportador de íons amônio em *A. brasilense* envolveu a amplificação de um pequeno fragmento deste gene por PCR utilizando-se oligonucleotídeos sintetizados quimicamente. Este fragmento foi clonado e utilizado como sonda em hibridização contra uma biblioteca genômica com a finalidade de se isolar o gene completo.

4.1.1 Planejamento de oligonucleotídeos e amplificação de DNA por PCR

Para determinar a sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR, foram comparadas sequências já conhecidas de transportadores de amônio de três organismos (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium tuberculosis*), (figura 5). A comparação destas sequências foi realizada pelo programa Clustal que faz alinhamentos de diversas sequências, permitindo a determinação das regiões comuns (alta homologia) entre aquelas analisadas.

Inicialmente foram escolhidas as regiões 1 e 2 (figura 5) para construção dos oligonucleotídeos. A sequência de aminoácidos foi convertida para sequência de nucleotídeos tomando-se como base uma tabela de preferência de uso de códons para *A. brasilense* descrita por SOUZA (1990), tabela 1. Como para certas posições havia a possibilidade de mais de um aminoácido e, como um único aminoácido pode ter mais de um códon, os “primers” construídos apresentavam-se degenerados em várias posições, ou seja, não foi sintetizado um único “primer” para cada região, mas sim uma população (figura 6A). Esta população de oligonucleotídeos foi utilizado para ensaios de amplificação de DNA por PCR. Foram testados parâmetros de temperatura de alta e baixa estringência durante as reações de PCR observando-se, entretanto, uma constância no aparecimento de vários produtos de amplificação (figura 7). Estes produtos de PCR apresentavam uma taxa de migração próxima do tamanho esperado (aproximadamente 150pb, já que entre as regiões 2 e 1, figura 5, existem mais ou menos 50 aminoácidos). Foram realizadas várias tentativas de se clonar estes fragmentos no vetor pTZ19R através de ligação em terminal cego, mas

Ecoli	MKIATIKTGLASLAMLPGLVMAAPAVADKADNAFMMICTALVLFMTIPGI
Mtuberculo	MDQFPIM-----GVPDGGDTAWMLVSSALVLLMT-PGL
Bsubtilis	MQMG-----DTVFMFFCALLVWLMT-PGL
	* * * * *
Ecoli	ALFYGGLIRGKNVLSMLTQVTVTFALVCILWVVYGYSLAFGEGNNFFGNI
Mtuberculo	AFFYGGMVRSKSVLNMIMMSISAMGVVTVLWALYGYSLAFGDDVGNIAGN
Bsubtilis	ALFYGGMVKSKNVLSMHSFSSIAIVSVWVLFYTLAFAPGNSIIGGL
	*.****.***. . . . * . . . * . . . * . . . *
	→ Região 4
Ecoli	N---WLMLKN-IELTAV-----MGSIYQYIHVAFQGSFAC
Mtuberculo	PSQYW-GLKGLIGVNAVAADPSTQTAAVNIPLAGTLPATVFVAFQLMFAI
Bsubtilis	E---WAGLKG-VGFDPGD-----YSDTIPHSLFMMFQMTFAV
	* ** * * *
Ecoli	ITVGLIVGALAERIRFSAVLIFVVVWLTLSYIPIAHMVWG-----GG
Mtuberculo	ITVALISGAVADRLKFGAWLLFAGLWATFVYFPVAHWVFAFDGFAAEHGG
Bsubtilis	LTTAIISGAFAERMRFGAFLLSVLWASLVYTPVAHWVWG-----GG
	. * . . * * * * * * . * . . * * * * . * * *
Ecoli	LLAS-HGALDFAGGTVVHINAAIAGLVGAYLIGKRVGFGKEAFKPHNLPM
Mtuberculo	WIANKLHAIDFAGGTAVHINAGVAALMLAIVLGKRRGWPATLFRPHNLPP
Bsubtilis	WIGQ-LGALDFAGGNVVHISSGVAGLVLAIVLGKRK--DGTASSPHNLIY
	. . * . * * * * * * * * * * * * *
	← Região 1 →
Ecoli	VFTGTAILYIGWFGFNAGSAGTANEIAALAFVNTVVATAAAILGWIFGEW
Mtuberculo	VMLGAALLWFGWYGFNAGSATTANGVAGATFVTTTITATAAAMLGWLLTER
Bsubtilis	TFLGGALIWFVGWFGFNVGSALTLDGVAMYAFINTNTAAAGIAGWILVEW
	* * . . * * * * * * * * . . * . . * * * * * * *
	← Região 2
Ecoli	ALRGKPSLLGACSGAIAGLVGVTACGYIGVGGALIIGVVAGLAGLWGVT
Mtuberculo	VRDGKATTGAASGIVAGLVAITPSCSSVNLGALAVGVSAGVLCALAV-
Bsubtilis	IINKKPTMLGAVSGAIAGLVAITPAAGFVTPFASIIIGIIGGAVCFWGVF
	* . . * * * * * . * * * * * . . * . *
Ecoli	MLKRLLRVDDPCDVFGVHVCIGIVGCIMTGIFAASSL---GGVGFAEGV
Mtuberculo	GLKFKLGFDDSLDVGVHLVGGVGLVGLLGLLAPEAPANGVAGVSKGL
Bsubtilis	SLKKKFGYDDALDAFGLHGIGGTWGGIATGLFATTSV---NSAG-ADGL
	* * . * * . * * . * . * . * . * . * . *
Ecoli	TMGHQL--LV--QLESIAITIVWSGVVAFIGYKLADLTVGLRVPEEQERE
Mtuberculo	FYGGGFAQLERQALGACSV-LVYSGIITLILALILKFTIGLRLDAEQEST
Bsubtilis	FYGDAS--LIWKQIVAIAATYVFVFIVTFVIIKIVSLFLPLRATEEEESL
	* * . . . * * * * *
Ecoli	GLDVNSHGENAYN-----A--
Mtuberculo	GIDEAEHAESGYDFAVASGSVLPPRVTVEDSRNGIQERIGQKVEAEPK
Bsubtilis	GLDLTMHGEKAYQ-----DSM
	* . * * . * . *

Figura 5 - Comparação de sequências para possíveis transportadores de íons amônio

(Continuação figura 5)

As sequências analisadas de transportadores de íons amônio dos organismos *E.coli*, *M.tuberculosis* e *B.subtilis* foram obtidas no banco de dados (GenBank). As sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa Clustal.

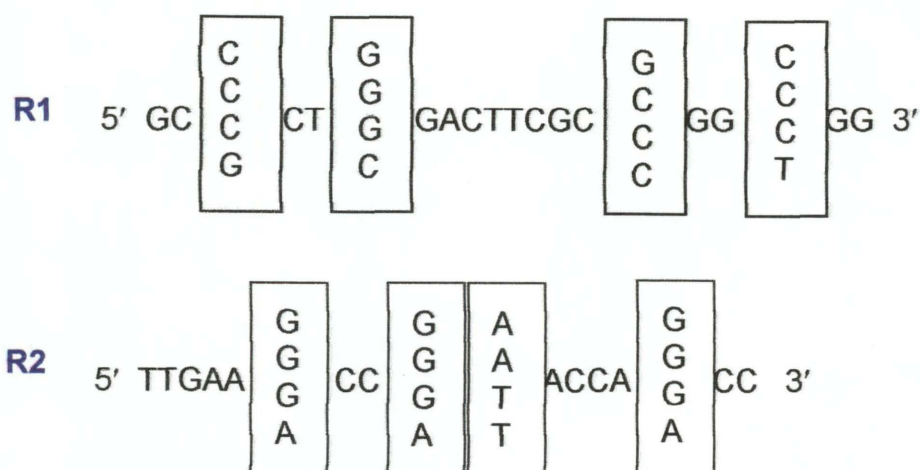
Os asteriscos (*) presentes abaixo das três sequências indica as posições onde ocorrem aminoácidos idênticos, enquanto os pontos (.) indicam substituições conservadas (aminoácidos de mesmo grupo). Os traços (-) presentes nas sequências indicam espaçamentos introduzidos na sequência pelo programa Clustal a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as três sequências analisadas.

As regiões em azul foram as regiões que apresentaram maior homologia e foram escolhidas para a síntese dos oligonucleotídeos. As setas indicam a direção de alongamento dos oligonucleotídeos sintetizados

Resíduo e codon	Hs	Ab	Ec	Resíduo e codon	Hs	Ab	Ec
% de uso				% de uso			
Phe TTT	17	3	44	Tyr TAT	29	10	41
Phe TTC	83	97	56	Tyr TAC	71	90	59
Leu TTA	2	0	6	* TAA	0	25	88
Leu TTG	22	1	8	* TAG	0	0	4
Leu CTT	2	2	9	His CAT	47	9	39
Leu CTC	17	26	7	His CAC	53	91	61
Leu CTA	3	0	2	Gln CAA	32	3	27
Leu CTG	55	71	69	Gln CAG	68	97	73
Ile ATT	25	3	37	Asn AAT	35	9	24
Ile ATG	69	97	62	Asn AAC	65	91	76
Ile ATA	6	0	1	Lys AAA	21	2	77
Met ATG	100	100	100	Lys AAG	79	98	23
Val GTT	4	6	38	Asp GAT	42	4	51
Val GTC	37	54	13	Asp GAC	58	96	49
Val GTA	14	0	23	Glu GAA	55	28	73
Val GTG	46	40	27	Glu GAG	45	72	27
Ser TCT	0	2	27	Cys TGT	40	0	42
Ser TCC	25	31	26	Cys TGC	60	100	58
Ser TCA	6	0	8	* TGA	100	75	8
Ser TCG	33	47	11	Trp TGG	100	100	0
Pro CCT	6	0	9	Arg CGT	26	6	58
Pro CCC	36	16	6	Arg CGC	51	81	35
Pro CCA	9	0	20	Arg CGA	0	0	2
Pro CCG	48	84	65	Arg CGG	21	11	3
Thr ACT	13	2	24	Ser AGT	17	0	6
Thr ACC	69	76	51	Ser AGC	19	20	22
Thr ACA	3	2	6	Arg AGA	2	0	1
Thr ACG	16	20	20	Arg AGG	0	2	<1
Ala GCT	5	5	28	Gly GGT	18	15	48
Ala GCC	67	70	19	Gly GGC	66	82	41
Ala GCA	5	0	23	Gly GGA	6	0	5
Ala GCG	23	25	30	Gly GGG	10	3	7

Tabela 1 - Comparação do uso de códons de *Herbaspirillum seropedicae* (Hs), *Azospirillum brasilense* (Ab) e *Escherichia coli* (Ec) (Souza, 1990)

A) Primers construídos sem sítio de restrição



B) Primers construídos com sítio de restrição

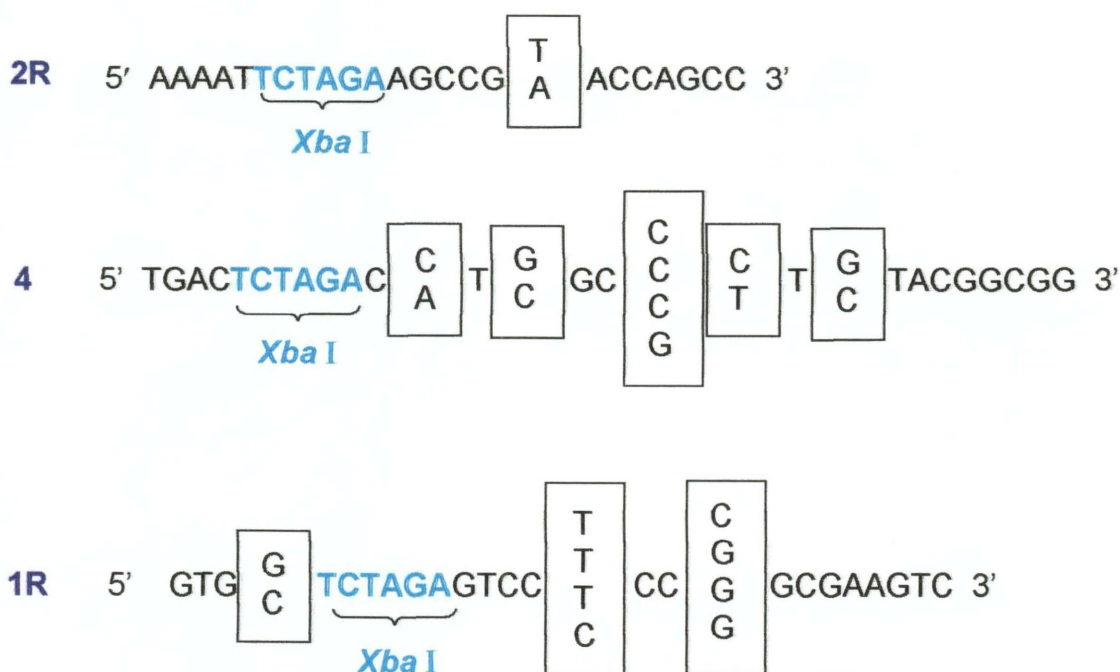


Figura 6 – Sequência dos oligonucleotídeos sintetizados quimicamente e utilizados como “primers” nas reações de PCR.

Em retângulos são apresentadas as variações de bases presentes nos oligonucleotídeos sintetizados. A) Oligonucleotídeos correspondentes às regiões 1 e 3 da sequência de aminoácidos da figura 5. B) Oligonucleotídeos correspondentes às regiões 1, 2 e 4 da sequência de aminoácidos da figura 5. Em azul é indicado o sítio para a enzima *Xba I* introduzidos nessas moléculas.

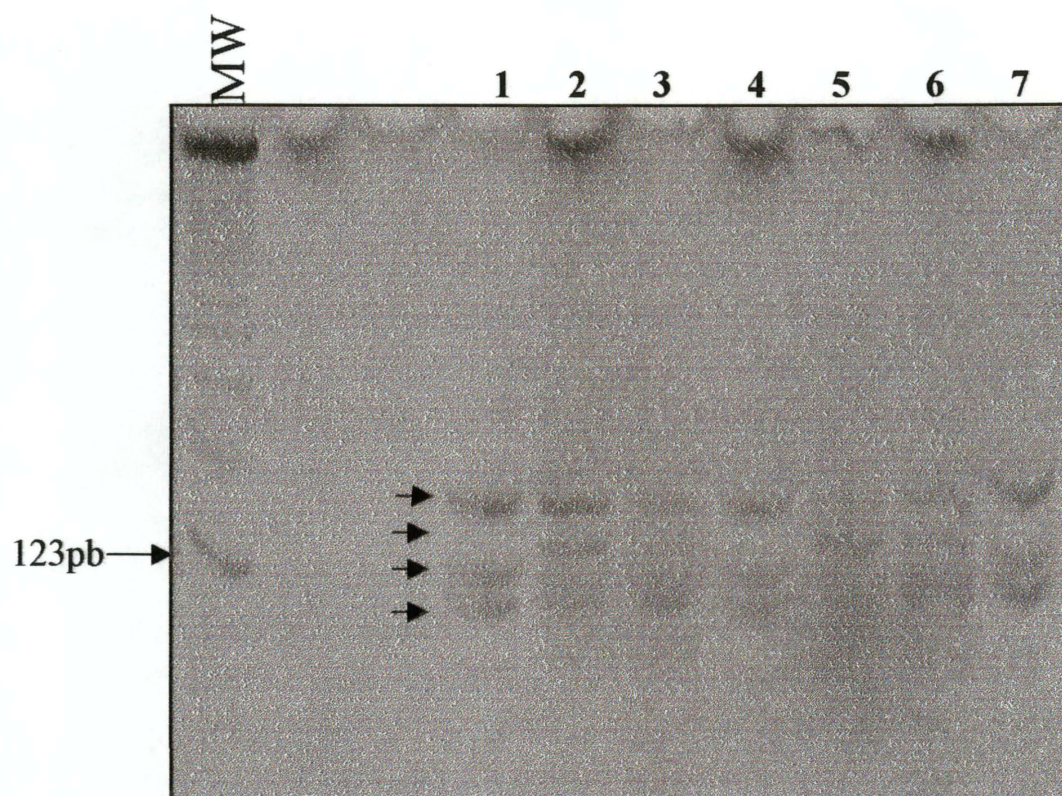


Figura 7 - Análise dos produtos de PCR obtidos com os “primers” R1 e R2

Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo. **MW** - Indica o marcador de massa molecular 123pb ladder (Gibco BRL). As linhas de 1 a 7 indicam produtos obtidos nas reações de PCR (indicados pelas setas) utilizando diferentes parâmetros nos ciclos de amplificação e obtidos utilizando-se os “primers” R1 e R2. Para a reação 1 (linha 1) foi utilizado o seguinte parâmetro: 1 ciclo de 94^o C por 10 minutos; 5 ciclos de 94^o C 5 minutos, 50^o C por 2 minutos, 72^oC por 2 minutos (para aumentar a temperatura de 50 para 72^o C o termociclador utilizou apenas 10% da sua velocidade de aquecimento); 25 ciclos de 94^o C por 1 minuto, 50^o C por 1 minuto, 72^oC por 2 minutos e finalmente, 1 ciclo de 72^o C por 10 minutos. Para as reações 2,3,4,5,6 e 7 a temperatura de anelamento dos “primers” da etapa de 5 ciclos foi de 45, 40, 35, 30, 25 e 20^o C, respectivamente.

não obtivemos nenhum resultado positivo. A ligação de DNA em terminal cego torna-se tecnicamente difícil principalmente para ligação de fragmentos de DNA com tamanho pequeno.

Perante esta situação, decidiu-se construir novos "primers" a partir das regiões 1, 2 e 4 (figura 5). Os oligonucleotídeos sintetizados apresentavam sítios para a enzima de restrição *Xba* I na região 5' (figura 6B), a fim de facilitar a posterior clonagem no vetor pTZ19R. Esta enzima foi escolhida porque reconhece a sequência (TCTAGA) que é rica em timinas e adeninas. Como o microorganismo em estudo possui uma alta percentagem de citosinas e guaninas no genoma (cerca de 67%), existia uma baixa possibilidade de ocorrerem sítios para *Xba* I no interior dos produtos de PCR. Outra característica é a presença da sequência CTAG pouco frequente em organismos com conteúdo C+G acima de 45% (MC CLELLAND *et al.*, 1987).

Novamente vários parâmetros dos ciclos das reações de PCR foram testados utilizando as duplas de "primers" 4/1R e 4/2R. Foram obtidos produtos utilizando-se os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 96°C por 10 minutos; 5 ciclos de 94°C 5 minutos, 40°C por 2 minutos, 72°C por 2 minutos (para aumentar a temperatura de 40 para 72°C o termociclador utilizou apenas 10% da sua velocidade de aquecimento); 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos com 20% da velocidade de aquecimento e finalmente, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

O produto de PCR obtido quando utilizamos os "primers" 4/1R mostrou-se aparentemente menos específica, uma vez que foram obtidos dois produtos com taxa de migração equivalente a 1.600pb e 800pb (figura 8). Se observarmos a figura 3, era esperado que se obtivesse um amplificado de aproximadamente 500pb, já que entre as regiões 1 e 4 temos aproximadamente 170 resíduos de aminoácidos. Foram realizadas várias tentativas de clonagem destes fragmentos mas não obtivemos nenhum resultado positivo.

Com a utilização dos "primers" 4 e 2R, foi obtido um único amplificado que migrou com um tamanho de aproximadamente 650pb (figura 8). Este fragmento apresenta tamanho próximo ao esperado, se considerarmos que a distância entre as regiões 4 e 2 é de aproximadamente 220 resíduos de aminoácidos (figura 5).

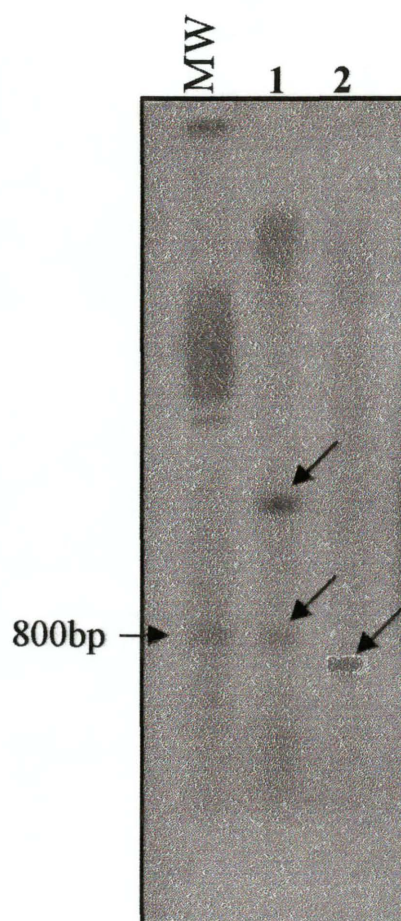


Figura 8 - Análise dos produtos de PCR obtidos com os “primers” 4/1R e 4/2R

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo. **MW** - Indica o marcador de massa molecular 100pb ladder (Pharmacia). Linha 1 mostra os produtos obtidos na reação de PCR (indicados pelas setas) utilizando-se os “primers” 1R/4. Linha 2 mostra o produto obtido na reação de PCR (indicado pela seta) utilizando os “primers” 2R/4.

O aparecimento de um maior número de produtos de PCR ocorreu quando utilizamos a dupla de "primers" 4 e 1R. Na figura 6 é possível notar que a sequência do "primer" 1R apresenta uma maior degenerescência do que o "primer" 2R. Para cada posição de degenerescência de cada primer (2R, 4 e 1R) podem ocorrer duas bases diferentes, o "primer" 1R possui 3 posições de degenerescência, ou seja, é composto de uma população de 8 moléculas com diferente sequência, o "primer" 2R é uma população de 2 moléculas diferentes e o "primer" 4 uma população de 32 moléculas diferentes. Sendo assim, o uso da dupla de "primers" 4 e 1R pode gerar 256 combinações diferentes e a dupla 4 e 2R apenas 64. Isso, juntamente com a baixa temperatura de anelamento podem explicar porque quando utilizamos os "primers" 4 e 1R nas reações de PCR surgem um maior número de produtos. Estas considerações também podem explicar o aparecimento de vários amplificadas nas reações onde foram utilizadas a dupla de "primers" R1/R2, neste caso, além da alta degenerescência apresentada, os "primers" tinham um menor tamanho (se comparados aos "primers" 1R, 2R e 4) o que pode facilita o anelamento inespecífico.

4.1.2 Clonagem do fragmento do gene *amtB*

O produto de PCR obtido com os "primers" 4 e 2R foi clonado no vetor pTZ19R através do sítio de restrição *Xba* I.

Células *E. coli* estripe XL1Blue foram eletroporadas com a mistura de ligação e semeadas em meio MacConkey contendo ampicilina (resistência do vetor pTZ19R, figura 9). Uma colônia apresentou-se branca em meio MacConkey indicando a ausência de atividade de β -galactosidase, devido a presença de uma inserção no vetor pTZ19R. A colônia selecionada foi crescida e o plasmídeo purificado. O resultado, apresentado na figura 10, indica uma diferença de taxa de migração entre o vetor pTZ19R (controle) e o plasmídeo recuperado do transformante. Esta diferença corresponde a cerca de 600pb indicando que esse plasmídeo contém o produto de PCR. Este plasmídeo recombinante foi denominado pLFH1.

O inserto presente no plasmídeo pLFH1 foi sequenciado utilizando-se os "primers" reverso e universal. Estes "primers" permitem o sequenciamento a partir da região do sítio de policlonagem do pTZ19R (figura 9). A comparação da sequência obtida com o banco de proteínas indicou alta homologia com transportadores de amônio de diversos organismos como mostra a figura 11. A nossa sequência

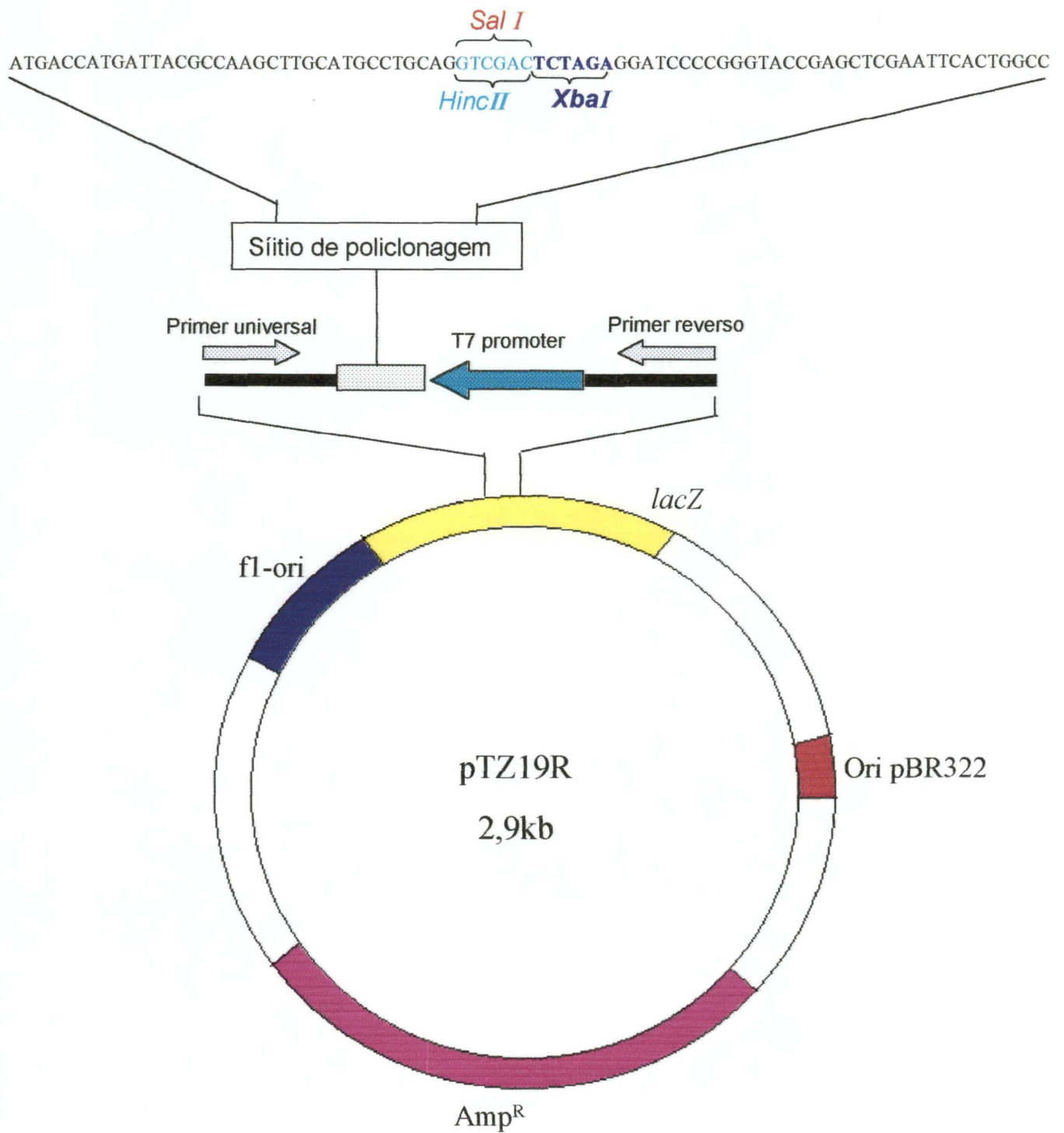


Figura 9- Esquema do vetor pTZ19R (MEAD *et al.*, 1986)

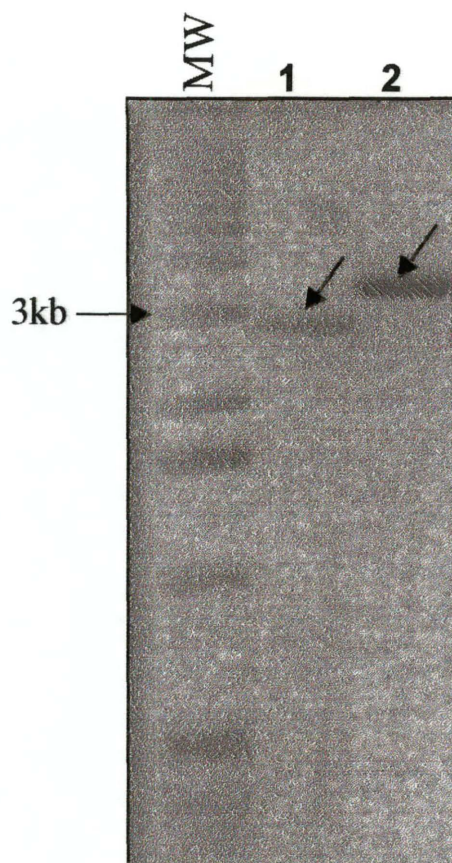


Figura 10 - Análise do plasmídeo recombinante pLFH1

Eletroforese em gel de agarose em 0,7% tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo. **MW** - Indica o marcador de massa molecular 1kb ladder (Pharmacia). Linha 1 mostra o vetor pTZ19R digerido com a enzima de restrição *HincII*. Linha 2 mostra o plasmídeo recombinante pLFH1 cortado com a enzima *HincII*.

1 - sp|Q07429|NRGA_BACSU PROBABLE AMMONIUM TRANSPORTER (MEMBRANE PROTEIN NRGA)

Identities = 83/169 (49%), Positives = 116/169 (68%), Gaps = 2/169 (1%)
Frame = +2

Query: 2 VRKMNVLSSVVMQSFAICCLVSIWFFAGYSIAFTEGTPYFGSLSKFMLAGITKD--SLTG 175
V+ NVLS M SF+ +VSIW GY++AF G G L L G+ D +
Sbjct: 31 VKSKNVLSTAMHSFSSIAIVSVVWLFGYTLAFAPGNSIIGGLEWAGLKGVGFDPGDYSD 90

Query: 176 VIPETIFVVFQMTFAIITPALITGAFADRMKFSSMLVFTGLWSLIVYAPITHHWVWGPGGY 355
IP ++F++FQMTFA++T A+I+GAFA+RM+F + L+F+ LW+ +VY P+ HWVWG GG+
Sbjct: 91 TIPHSLFMMFQMTFAVLTTAISGAFAERMRFAGALLFSVLWASLVYTPVAHVWVG-GGW 149

Query: 356 LAGDGVLDYAGGTVVHINAGVAGLVAAIVLGKRKGHPNENFAPHNLVLSLI 508
+ G LD+AGG VVHI++GVAGLV AIVLGKRK +PHNL+ + +
Sbjct: 150 IGQLGALDFAGGNVVHISGAGLVLAIVLGKRK--DGTASSPHNLIYTFL 198

2 - sp|P37905|AMTB_ECOLI PROBABLE AMMONIUM TRANSPORTER

Identities = 83/164 (50%), Positives = 107/164 (64%)
Frame = +2

Query: 2 VRKMNVLSSVVMQSFAICCLVSIWFFAGYSIAFTEGTPYFGSLSKFMLAGITKDSLTVGI 181
+R NVLS++ Q LV ILW GYS+AF EG +FG+++ ML I ++ G I
Sbjct: 58 IRGKNVLSMLTQVTVTTFALVCILWVVYGYSLAFGEENFFGNINWMLKNIELTAVMGSI 117

Query: 182 PETIFVVFQMTFAIITPALITGAFADRMKFSSMLVFTGLWSLIVYAPITHHWVWGPGGYLA 361
+ I V FQ +FA IT LI GA A+R++FS++L+F +W + Y PI H VWG GG LA
Sbjct: 118 YQYIHVAFQGSFACITVGLIVGALAERIRFSAVLIFVVVWLTLSYIPIAHMVWG-GGLLA 176

Query: 362 GDGVLDYAGGTVVHINAGVAGLVAAIVLGKRKGHPNENFAPHNL 493
G LD+AGGTVVHINA +AGLV A ++GKR G E F PHNL
Sbjct: 177 SHGALDFAGGTVVHINAAIAGLVGAYLIGKRVGFGKEAFKPHNL 220

Figura 11 – Resultado da comparação da sequência obtida do produto de PCR clonado no plasmídeo pLFH1 com banco de dados a nível de proteína, utilizando o programa BlastX (ALTSCHUL et al.,1997).

"Query" indica a sequência de aminoácidos obtida a partir do fragmento clonado. "Sbjct" indica a sequência depositado no banco de dados. Aminoácidos idênticos entre as duas sequências são indicados, (+) indica aminoácidos de mesmo grupo, (-) indica intervalos impostos pelo programa durante o alinhamento das sequências. As espécies indicadas são 1- BACSU – *Bacillus subtilis*, 2- ECOLI – *Escherichia coli*.

Estão indicados as sequências depositadas no banco de dados (GenBank) que apresentaram maior homologia com a sequência submetida.

apresentou 49% de identidade e 68% de similaridade com um provável transportador de amônio de *Bacillus subtilis* denominado NrgA e 50% de identidade e 64% de similaridade com a proteína AmtB de *Escherichia coli* (Tabela 2). Na figura 12 está indicado o alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do fragmento do gene *amtB* de *A. brasilense* com transportadores de íons amônio de *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus subtilis* (os quais foram utilizados para determinar a sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR). Este alinhamento pode explicar porque quando utilizamos a dupla de “primers” 4/1R nas reações de PCR não obtivemos nenhum produto com o tamanho esperado. A figura 12 mostra que a região tomada como base para determinar a sequência do “primer” 1R possui 2 aminoácidos diferentes em *A. brasilense*, sendo que a troca de uma Alanina (A) por uma Valina (V) neste organismo, não permite que o terminal 3’ do “primer” sintetizado se alinhe corretamente com o DNA cromossomal de *A. brasilense* e, desta forma, a DNA polimerase não consegue estender a cadeia.

A sequência obtida de DNA obtida a partir do produto de PCR clonado (figura 13) foi depositada no GenBank e possui número de acesso AF082303.

4.2 Clonagem do gene *amtB* completo

O produto de PCR clonado no plasmídeo pLFH1 (item 4.1.2) foi utilizado como sonda em hibridizações contra uma biblioteca genômica de *A. brasilense* para a obtenção de uma clone contendo o gene completo.

Inicialmente havia sido proposto o uso de uma biblioteca genômica de *A. brasilense* construída no cosmídeo pLAFR3 e mantida em *E. coli* estirpe HB101. A autoradiografia apresentada na figura 14 mostra o resultado de uma das placas utilizadas nas hibridizações. É possível observar um alto “background” de hibridização, dificultando a visualização de possíveis clones positivos. Tecnicamente a clonagem a partir desta biblioteca produz um alto “background” devido ao alto conteúdo de DNA cromossômico da estirpe hospedeira do banco *E. coli*, que possui sequência bastante homóloga ao nosso fragmento (figura 15), e devido ao baixo número de cópias do vetor pLAFR3. Devido a isso, decidimos construir um banco de genes de *A. brasilense* FP2 no bacteriófago λ EMBL3.

Organismo	Gene	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Provável transportador de amônio	51	67
<i>Escherichia coli</i>	<i>amtB</i>	50	64
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>nrgA</i>	49	69
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Provável transportador de amônio	47	63
<i>Aquifex aeolicus</i>	Provável transportador de amônio	48	69
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	Provável transportador de amônio	45	62
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>mep2</i>	41	56
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>mep3</i>	42	61
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>mep1</i>	39	57
<i>Synechocystis</i> P666803	Provável transportador de amônio	33	57
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>amt</i>	40	55

Tabela 2 – Níveis de similaridade da sequência obtida do produto de PCR clonado no plasmídeo pLFH1 com sequências depositadas no banco de dados.

Estão indicados as sequências depositadas no banco de dados (GenBank) que apresentaram maior homologia com a sequência submetida. A comparação foi realizada a nível de proteína utilizando o programa BlastX (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

E.coli			IRG
B.subtilis			VKS
A.brasilense			VRK
M.tuberculosis			VRS
			..
E.coli	KNVLSMLTQVTVTFFALVCILWVVYGYSLAFGE-----GNN--FFGNINWLMLKNIELT-		
B.subtilis	KNVLSTAMHSFSSIAIVSIVVWVLFQYTALAFAP-----GNS--IIGGLEWAGLKGVGFDP		
A.brasilense	MNVLSVVMQSFAICCLVLSILWFFAGYSIAFTE-----GTP--YFGSLSKFMLAGITKD-		
M.tuberculosis	KSVLNMIMMSISAMGVVTVLWALYGYSLAFGDDVGNIAGNPSQYWGLKGLIGVNAVAADP		
	. ** . . * . * . * . * . .		
E.coli	-----AVMGSIYQYIHVAFQGSFACITVGLIVGALAERIRFSAVLIFVWVWLTLSY		
B.subtilis	-----GDYSDTIPHSLFMMFQMTFAVLTTAII SGAFARMRFGAFLLSVLWASLVY		
A.brasilense	-----SLTGVI PETIFVVFQMTFAIITPALITGAFADRMKFSSMLVFTGLWSLIVY		
M.tuberculosis	STQTAAVNIPLAGTLPATVFVAFQLMFAIITVALISGAVADRLKFGAWLLFAGLWATFVY		
 * * * . * . * * * . * . * . * . *		
E.coli	IPIAHMVWG-GGLLASHG-----ALDFAGGTVVHINAAIAGLVGAYLIGKRVGFGKE		
B.subtilis	TPVAHWVWG-GGWIGQLG-----ALDFAGGNVVHISSGVAGLVLAIVLGKRK--DGT		
A.brasilense	APITHWVWGPGGYLAGDG-----VLDYAGGTVVHINAGVAGLVAAIVLGKRGKHPNE		
M.tuberculosis	FPVAHWVFAFDGFAAEHGGWIANKLH AIDFAGGTAVHINAGVAALMLAIVLGKRRGWPAT		
	* . * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *		
E.coli	AFKPHNLPMVFT		
B.subtilis	ASSPHNLIYTFL		
A.brasilense	NFAPHNLVLSLI		
M.tuberculosis	LFRPHNLPFVML		
	**** .		

Figura 12 - Alinhamento da sequência de aminoácidos deduzida do fragmento do gene *amtB* de *A. brasilense* com transportadores de íons amônio de *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bacillus subtilis*.

As sequências de *E. coli*, *M. tuberculosis* e *B. subtilis* foram obtidas no banco de proteínas. As sequências foram alinhadas pelo programa Clustal. Aminoácidos idênticos estão indicados por asteriscos (*) e substituições conservadas por pontos (.). Os traços (-) presentes nas sequências indicam intervalos introduzidos pelo programa a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as sequências analisadas.

Em roxo, está destacada a sequência de aminoácidos tomada como base para síntese do “primer” 1R. Em azul, estão destacado os dois aminoácidos que são substituídos em *A. brasilense*


```
1  GGTCCGCAAGATGAACGTGCTGTCGGTCGTGATGCAGAGCTTTGCGATCTGCTGCCTGGT
61  CAGCATCCTGTGGTTCTTCGCCGGTTACAGCATCGCCTTTACCGAAGGCACCCCGTATTT
121 CGGCAGCCTGTCCAAGTTCATGCTGGCCGGCATCACCAAGGACAGCCTGACGGGCGTCAT
181 TCCCGAGACGATCTTCGTCGTCTTCAGATGACCTTCGCCATCATCACCCCGGCCCTGAT
241 CACCGGCGCCTTCGCCGACCGCATGAAGTTCTCCTCGATGCTGGTCTTCACGGGCGCTGTG
301 GTCGCTGATCGTCTACGCGCCGATCACCCACTGGGTCTGGGGTCCGGGCGGCTATCTGGC
361 GGGTGACGGCGTGCTCGACTACGCCGGCGGCACCGTGGTGCACATCAACGCGGGCGTGGC
421 CGGTCTGGTCGCCGCCATCGTGCTGGGCAAGCGCAAGGGCCATCCGAACGAGAACTTCGC
481 TCCGCACAACCTGGTGCTCAGCCTGATCGG
```

Figura 13 – Sequência de DNA do fragmento obtido por PCR clonado.

O sequenciamento foi realizado conforme descrito em Material e Métodos

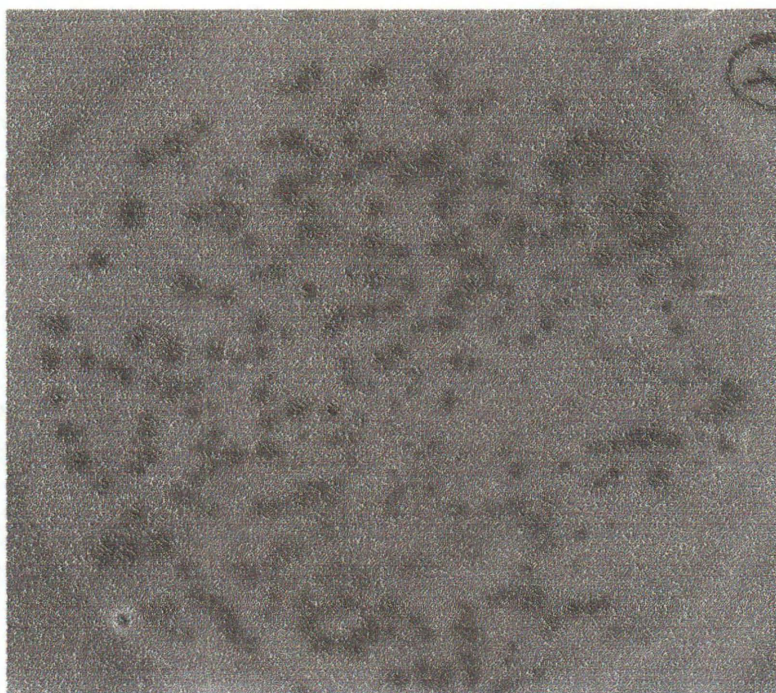


Figura 14 - Autoradiografia da hibridização de uma das placas do banco de genes de *A. brasilense* em pLAFR3 contra o fragmento do gene *amtB* de *A. brasilense*.

O fragmento do gene *amtB* foi marcado com [^{32}P] e hibridizado contra a membrana contendo DNA conforme descrito em Material e Métodos.

```

E.coli      CGCTGGTGCTGTTTATGACTATTCCGGGGATTGCCCTGTTTTACGGTGGGTGATTTCGCG
A.brasil    -----GGTCCGCA
                                     *  ***

E.coli      GCAAAAACGTGCTGTCGATGCTGACGCAGGTGACGGTGACATTTGCACTGGTCTGTATTC
A.brasil    AGATGAACGTGCTGTCGGTCGTGATGCAGAGCTTTGCGATCTGCTGCCTGGTCAGCATCC
               *  ***** *  ***  ***          *  **  *          ***** *  **  *

E.coli      TCTGGGTGGTTTACGGTTACTCGCTGGCGTTTGGTGAGGGCAACAACCTTCTTCGGCAACA
A.brasil    TGTGGTTCTTCGCCGGTTACAGCATCGCCTTTACCGAAGGCACCCCGTATTTCCGGCAGCC
               *  ***  *  *  *****          *  **  ***          **  *****  *  *  *****  *

E.coli      TTAAGTGGTTGATGCTGAAAAACATCGAACTGACGGCGGTGATGGGCAGCATTATCAGT
A.brasil    TGTCCAAGTTCATGCTGGCCGGCATCACCAAGGACAGCCTGACGGGCGTCATTCCCGAGA
               *  *  ***  *****          *****          *  ***  *****  *****  **

E.coli      ATATCCACGTGGCGTTTCAGGGATCGTTTGCCTGCATTACCGTCGGCTTGATAGTTGGGG
A.brasil    CGATCTTCGTCGTCTTCCAGATGACCTTCGCCATCATCACCCCGGCCCTGATCACCGGCG
               ***  ***  *  **  ***          *  **  ***          ***  ***          *  *  *****  **  *

E.coli      CGCTGGCGGAACGAATCCGCTTCTCAGCTGTGTTGATTTTCGTGGTGGTATGGCTGACGC
A.brasil    CCTTCGCCGACCGCATGAAGTTCTCCTCGATGCTGGTCTTCACGGGCGCTGTGGTCGCTGA
               *  *  **  **  **  **          *****  *  **  **  *  **  **  **          *  **  **  *  *

E.coli      TCTCTTACATTCCGATTGCGCATATGGTGTGGGGC---GGTGGTTTGCTGGCTTCTCACG
A.brasil    TCGTCTACGCGCCGATCACCACTGGGTCTGGGGTCCGGGCGGCTATCTGGCGGGTGACG
               **  ***  *****  *  **          ***  *****          **  **  *  *****  *  ***

E.coli      GTGCGCTGGATTTGCGGGGTGGCACCGTGGTGCACATTAACGCCGAATCGCCGGTCTGG
A.brasil    GCGTGCTCGACTACGCCGGCGGCACCGTGGTGCACATCAACGCCGGGCGTGGCCGGTCTGG
               *  *  ***  **  *  ***  **  *****  *****  *  *  *****

E.coli      TGGGCGCGTATCTGATAGGAAAACGCGTGGGCTTCGGTAAAGAGGCGTTTAAACCGCACA
A.brasil    TCGCCGCCATCGTGCTGGGCAAGCGCAAGGGCCATCCGAACGAGAACTTCGCTCCGCACA
               *  *  ***          **  *  **  **  **  *****          **  ***          **  *****

E.coli      ACCTGCCGATGGTCTTCACCGGGACTGCCATTCTCTATATCGGTTGGTTTGGCTTTAACG
A.brasil    ACCTGGTGCTCAGCCTGATCGG-----
               *****  *  *          *  *  *  ***

```

Figura 15 – Comparação entre a sequência do fragmento do gene *amtB* de *A. brasilense* clonado com o gene *amtB* de *E. coli*

"E.coli" indica a sequência do gene *amtB* de *E. coli*. "A.brasil" indica a sequência do fragmento do gene *amtB* de *A. brasilense*. Os asteriscos (*) presentes abaixo das sequências indicam as posições onde ocorrem nucleotídeos idênticos, os traços (-) presentes nas sequências indicam intervalos introduzidos na sequência pelo programa Clustal a fim de fornecer o melhor alinhamento entre as duas sequências analisadas.

4.3 Construção de uma biblioteca genômica de *Azospirillum brasilense* no fago λ EMBL3

Após a produção em larga escala em *E. coli* estirpe LE392, o bacteriófago λ EMBL3 foi purificado conforme descrito em Material e Métodos. O vetor λ EMBL3 possui uma região no seu genoma que não codifica nenhuma proteína essencial para a sua replicação e encapsulamento, esta região é denominada “central stuffer” (figura 4). Para a construção do banco de genes neste vetor, o “central stuffer” é retirado e substituído pelo DNA exógeno. Logo após purificado, o DNA do fago λ EMBL3 foi digerido com a enzima *Bam* HI e submetido a uma ultracentrifugação em gradiente de sacarose (como descrito no item 3.18.2) para separar os “braços” do fago do fragmento “central stuffer”. A figura 16 apresenta as amostras mais puras retiradas do gradiente.

O DNA genômico de *A. brasilense* foi parcialmente digerido com *Sau* 3A, esta enzima foi escolhida porque reconhece 4 bases o que provocaria um maior número de quebras no genoma e também por gerar um terminal coesivo com a enzima *Bam*HI. O DNA genômico digerido foi submetido a uma ultracentrifugação em gradiente de sacarose para a separação dos fragmentos de DNA pelo tamanho, o resultado obtido está indicado na figura 17. As frações do gradiente entre as alíquotas 11 e 13 foram agrupadas e utilizadas para ligação do DNA com os braços do bacteriófago λ EMBL3.

O gradiente de sacarose foi escolhido como técnica de separação de DNA por tamanho porque ela permite uma menor perda de DNA se comparada com a técnica de separação por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão.

Os braços purificados do fago foram ligados ao DNA parcialmente digerido de *A. brasilense* e , após confirmada a ligação por eletroforese em gel de agarose, a mistura de ligação foi submetida a reação de empacotamento *in vitro* (item 3.18.4). Após o empacotamento foram realizadas infecções em *E. coli* LE392 (como descrito no item 3.18.5) para análise das construções obtidas. O resultado desta infecção revelou uma baixa eficiência na produção de bacteriófagos recombinantes já que com a adição de 200 μ L da reação de empacotamento (de um total de 1,5mL) foi observada apenas duas placas de lise sendo que seria esperado cerca de 100 placas de lise com apenas 1 μ L da reação de empacotamento. Este resultado

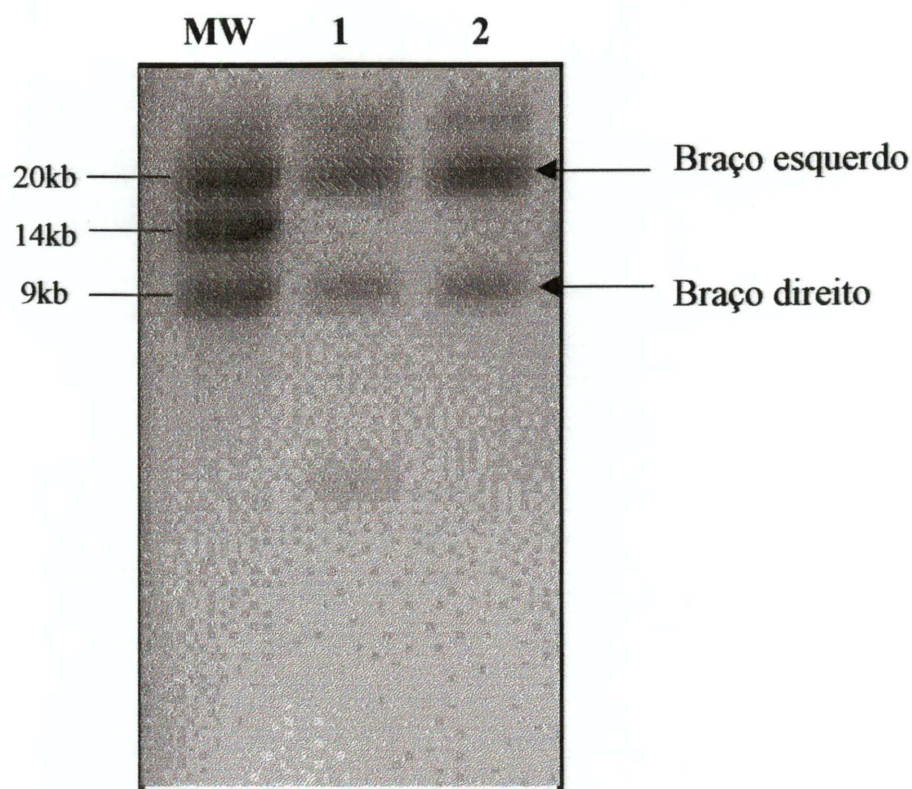


Figura 16 - Análise da purificação dos “braços” do λ EMBL3 por ultracentrifugação

Eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo. **MW** - Indica o marcador de massa molecular (DNA do λ EMBL3 digerido com *Bam* HI) e as linhas **1** e **2** mostram as frações mais purificadas do gradiente de sacarose após ultracentrifugação do DNA do λ EMBL3 digerido com *Bam* HI. As setas indicam os braços direito e esquerdo do λ EMBL3.

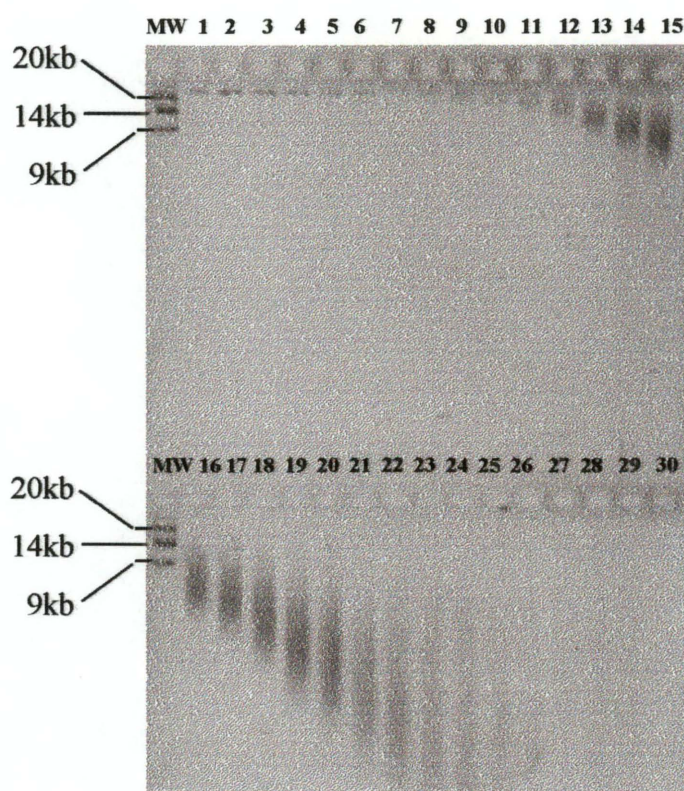


Figura 17 - Análise das frações obtidas por ultracentrifugação em gradiente de sacarose do DNA total de *A. brasilense* parcialmente digerido com *Sau 3A*.

Eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão TAE 1X, corado com brometo de etídeo. **MW** - Indica o marcador de massa molecular (λ EMBL3 digerido com *Bam* HI) e as linhas **1** a **30** mostram alíquotas de diferentes frações retiradas do gradiente de sacarose.

negativo continua sem explicação, já que foram realizados os seguintes controles: 1- Confirmamos a ligação do DNA genômico com os braços do fago por eletroforese em gel de agarose, 2- A eficiência da mistura de empacotamento foi determinada por um teste recomendado pelo fabricante (Pharmacia). 3 – A suscetibilidade a infecção da *E. coli* LE392 pelo λ EMBL3 selvagem também foi confirmada.

Estamos tentando novamente realizar a construção desta biblioteca genômica para isolar o restante do gene dar continuidade ao trabalho.

4.4 Comparação da sequência do produto de PCR clonado com o gene *amtB* de *A. brasilense* Sp7

Enquanto estávamos procedendo a construção da biblioteca genômica de *A. brasilense*, a sequência completa do gene *amtB* para a linhagem Sp7 de *A. brasilense* foi publicada por VAN DOMMELEN *et al.* (1998). A comparação das sequências de nucleotídeos está ilustrada na figura 18. Embora tenham sido observadas bases diferentes em relação a sequência publicada por VAN DOMMELEN *et al.* (1998), estes resultados indicam que o fragmento clonado é parte do gene envolvido no transporte de amônio em *A. brasilense*. A diferença entre as duas sequências pode ser devido a dois fatores:

- 1- A metodologia utilizada para clonagem deste fragmento. O nosso fragmento foi obtido por reação de PCR, este pode ter sofrido alterações de bases durante as amplificações. A sequência publicada por VAN DOMMELEN *et al.* (1998) foi obtida a partir de um fragmento de DNA isolado de uma biblioteca genômica o que permite uma maior fidelidade.
- 2- A mutações ocorridas no DNA genômico da bactéria. Ao analisar a comparação da sequência de aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos (figura 19) é possível observar que uma das trocas de nucleotídeo não altera o aminoácido, porém, o outro nucleotídeo substituído causa a mudança de uma Histidina por uma Tirosina, ou seja, troca-se um aminoácido com carga positiva por um aminoácido não protonado. Esta mutação pode ter se perpetuado na estirpe FP2 desde que esta troca de aminoácido não tenha afetado a proteína funcionalmente.

|AF005275|AF005275 *Azospirillum brasilense* ammonium transporter AmtB
(amtB) gene

Identidade = 508/510 (99%)

```

Query: 1      ggtccgcaagatgaacgtgctgctcggtcgatgcagagctttgcgatctgctgcctggt 60
              |||
Sbjct:552     ggtccgcaagatgaacgtgctgctcggtcgatgcagagctttgcgatctgctgcctggt 611

Query: 61     cagcatcctgtggttcttcgccggttacagcatcgcctttaccgaaggcaccccgatttt 120
              |||
Sbjct: 612     cagcatcctgtggttcttcgccggttacagcatcgcctttaccgaaggcaccccgatttt 671

Query: 121     cggcagcctgtccaagttcatgctggccggcatcaccaaggacagcctgacgggcgtcat 180
              |||
Sbjct: 672     cggcagcctgtccaagttcatgctggccggcatcaccaaggacagcctgacgggcgtcat 731

Query: 181     tcccgagacgatcttcgctgctcttcagatgaccttcgccatcatcaccccgccctgat 240
              |||
Sbjct: 732     tcccgagacgatcttcgctgctcttcagatgaccttcgccatcatcaccccgccctgat 791
                                   *

Query: 241     caccggcgcttcgccgaccgcatgaagttctcctcgatgctggtcttcacgggcctgtg 300
              |||
Sbjct: 792     caccggcgcttcgccgaccgcatgaagttctcctcgatgctggtcttcacgggcctgtg 851

Query: 301     gtcgctgatcgtctacgcgccgatcacccactgggtctggggtccggggcggtatctggc 360
              |||
Sbjct: 852     gtcgctgatcgtctacgcgccgatcacccactgggtctggggtccggggcggtatctggc 911

Query: 361     gggtgacggcgtgctcgactacgccggcgccaccgtggtgcacatcaacgcgggcgtggc 420
              |||
Sbjct: 912     gggtgacggcgtgctcgactacgccggcgccaccgtggtgcacatcaacgcgggcgtggc 971

Query: 421     cggctctggtcgccgccatcgtgctgggcaagcgcaagggccatccgaacgagaacttcgc 480
              |||
Sbjct: 972     cggctctggtcgccgccatcgtgctgggcaagcgcaagggctatccgaacgagaacttcgc 1031
                                   *

Query: 481     tccgcacaacctggtgctcagcctgatcgg 510
              |||
Sbjct: 1032    tccgcacaacctggtgctcagcctgatcgg 1061

```

Figura 18 – Resultado da comparação da sequência do produto de PCR clonado com o gene *amtB* de *A. brasilense*.

"Query" indica a sequência de aminoácidos obtida a partir do fragmento clonado. "Sbjct" indica a sequência obtida por VAN DOMMELEN *et al* (1998). Os traços entre as duas sequências indicam as posições onde ocorrem nucleotídeos idênticos. Os asteriscos (*) indicam bases diferentes entre as duas sequências.


```

parcial      VRKMNVL SVVMQSF AICCLV SILWFFAGYSIAFTEGTPYFGSLSKFMLAGI
completa     VRKMNVL SVVMQSF AICCLV SILWFFAGYSIAFTEGTPYFGSLSKFMLAGI
*****

parcial      TKDSL TGVI PETIFVVFQMTFAIITPALITGAFADRMKFSSMLVFTGLWSLIVYAPITHW
completa     TKDSL TGVI PETIFVVFQMTFAIITPALITGAFADRMKFSSMLVFTGLWSLIVYAPITHW
*****

parcial      VWGP GGYLAGDGVLDYAGGT VVHINAGVAGLVAAIVLGKRKGHPNENFAPHNLVLSLIG-
completa     VWGP GGYLAGDGVLDYAGGT VVHINAGVAGLVAAIVLGKRKGYPNENFAPHNLVLSLIGA
*****

```

Figura 19 – Comparação da sequência de aminoácidos deduzida do fragmento do gene clonado com a sequência de aminoácidos deduzida a partir do gene *amtB* de *A. brasilense*.

"parcial" indica a sequência de aminoácidos obtida a partir do fragmento clonado. "completa" indica a sequência obtida por VAN DOMMELEN *et al* (1998). Os asteriscos (*) presentes abaixo das sequências indicam as posições onde ocorrem aminoácidos idênticos. Os aminoácidos Histidina (H) e Tirosina (Y), destacados em azul, indicam a única posição onde ocorre mudança de aminoácido entre as duas sequências.

A sequência publicada por VAN DOMMELEN *et al* (1998) revelou que o gene *amtB* não faz parte do operon *glnK-amtB* como em outros microorganismos diazotróficos e que sua expressão é dependente de um promotor tipo sigma-54 e da proteína ativadora NtrC, sendo portanto, somente expresso em baixas concentrações de amônio.

A técnica utilizada por VAN DOMMELEN *et al* (1998) para clonagem do gene *amtB* foi semelhante a nossa. Eles também utilizaram reações de PCR, com "primers" degenerados, para amplificação de um fragmento do gene a ser utilizado como sonda para se hibridizar contra uma biblioteca genômica de *A. brasilense*.

Os nossos resultados mostram que a estratégia utilizada permite a clonagem de genes de interesse. A dificuldade em nosso caso foi decorrente do alto "background" obtido quando utilizamos a biblioteca genômica em cosmídeo pLAFR3. Entretanto, embora não tenhamos obtido a sequência completa do gene *amtB*, o fragmento obtido permitirá a obtenção de mutantes insercionais *amtB* e estudos fisiológicos do transporte do íon amônio em *A. brasilense* estirpe FP2.

5. CONCLUSÕES

- Um fragmento de DNA de aproximadamente 550bp foi amplificado a partir do DNA genômico de *A. brasilense* utilizando “primers” degenerados cujas sequências foram baseadas em regiões de alta homologia de transportadores de amônio já sequenciados;
- Esse fragmento foi clonado e sequenciado;
- A análise da sequência de aminoácidos deduzida a partir de fragmento de DNA clonado indicou alta similaridade (acima de 50%) com transportadores de íons amônio de diversos organismos;
- Esse fragmento de DNA clonado foi identificado como parte do gene *amtB* de *A. brasilense* estirpe FP2.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLEER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., v.25, p.3389–3402, 1997.
- BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *E. coli* J.Bacteriol., v.164, p.816-822, 1985.
- DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., elevation of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Comglomeromonas*, *Comglomeromonas parooensis* sp. nov. System. Appl. Microbiol., v. 20, p. 72-77, 1997.
- de MEL, V. S. J.; KAMBEROV, E. S.; MARTIN, P. D.; ZHANG, J.; NINFA, A. J.; EDWARDS, B. F. P. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals of the P_{II} protein from *E. coli* J. Mol. Biol., v.243, p. 796-798, 1994.
- de FRANCESCO, R.; ZANETTI, G.; BARBIERI, P.; GALLI, E. Auxin production by *Azospirillum brasilense* under different cultural conditions. In: KLINGMULLER, W. ed. *Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin, Springer-Verlag. p.109-15. 1985.
- de ZAMAROCZY, M. Strucural homologues P_{II} and P_Z of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signalling for selective regulation of varios nitrogen-dependent functions. Mol. Microbiol. v. 29(2), p. 449-463, 1998.

- DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In BALLOWS, A., TRUPPER, H.G., DWORKING, M., HARDER, W. The Prokaryotes. 2.ed., v. 3., p.2236-3353, 1991.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. eds. Proceedings. of the 1st. Intl. Symp. Nitrogen Fixation. v.2 Pullman, Washington Univ. Press. p.518-38, 1976.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. Science Tech Publishers/Springer-Verlag., 1987.
- DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationship of NtrC and NifA from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. EMBO J. v.5, p.441-447, 1983.
- EADY, R. R. Enzymology in free-living diazotrophs. In BROUGHTON, W. J.; PUHLER, S. (eds.) Nitrogen Fixation., v.4. p.1-49, 1986.
- FANI, R.; BANDI, C.; BAZZICALUPO, M.; CECCHERINI, M. T.; FANCELI, S.; GALLORI, E.; GERACE, L.; GRIFONI, A.; MICLAUS N.; DAMIANI, G. Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence. FEMS Microbiol. Lett., v.129, p.195-200, 1995.
- FISCHER, H-M. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. Microbiol. Rev., v.58, p.352-386, 1994.
- HARTMANN, A.; KLEINER, D. Ammonium (methylammonium) transport by *Azospirillum* spp. FEMS Microbiol. Lett., v. 15, p. 65-67, 1982.

- HAWKES, T.; MERRICK, M.; DIXON, R. Interaction of purified NtrC protein with nitrogen regulated promoters from *Klebsiella pneumoniae*. Mol. Gen. Genet., v.201, p. 492-498, 1985.
- HOREMANS, S.; VLASSAK, K. Production of indol-3-acetic acid by *Azospirillum brasilense*. In: KLINGMULLER, W. ed. *Azospirillum III: Genetics, Physiology, Ecology*. Berlin, Springer-Verlag, p.109-15, 1985.
- KAISER, B. N.; FINNEGAN, P. M.; TYERMAN, S. D.; WHITEHEAD, L. F.; BERGERSEN, F. J.; DAY, D. A.; UDVARDI, M. K. Characterization of an ammonium transporter protein from the peribacterioid membrane of soybean nodules. Science, v. 281, p. 1202-1206, 1998.
- KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; HENIS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. Can. J. Microbiol., v. 31, p. 881-887, 1985.
- KEENER, J.; KUSTU, S. Protein kinase and phosphoprotein phosphatase activities of nitrogen regulatory proteins NtrB and NtrC of enteric bacteria: roles of the conserved amino-terminal domain of NtrC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.85, p.4976-4980, 1988.
- KLEINER, D. The transport of NH_3 and NH_4^+ across biological membranes. Biochim. Biophys. Acta., v.639, p.41-52, 1981.
- KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In BROWN, T. A., Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p.185-208, 1991.
- MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. Can. J. Microbiol., v.37, p.549-553, 1991.

- MACHADO, H. B.; YATES, M. G.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. The *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense* are part of a *nifR3*-like-*ntrB-ntrC* operon and are negatively regulated. Can. J. Microbiol., v.41, p.674-684, 1995.
- MARINI, A.; VISSERS, S.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. Cloning and expression of the *MEP1* gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. v. 13, No. 15, p. 3456-3463, 1994.
- MARTIN, D. e REINHOLD-HUREK, B. Molecular analysis of three P_{II} -like signal transmitter proteins in the diazotroph *Azoarcus* sp. BH72. Livro de resumos do 12th International congress on nitrogen fixation. No.12.11, 1999.
- Mc CLELLAND, M.; JONES, M.; PATEL, Y.; NELSON, M. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. Nucleic. Acids Res. v.15, p.5985-6005, 1987.
- MEAD, D. A.; SZCZENA-SKORUPA, E.; KEMPER, B. Single strand DNA "blue" T7 promoter plasmids a versatile tandem promoter system for cloning and protein engineering. Prot. Eng., v.1, p.67-74, 1986.
- MELETZUS, D.; RUDNICK, N. D.; GREEN, A.; KENNEDY, C. Characterization of the *glnK-amtB* operon of *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. v.180, No.12, p.3260-3264, 1998.
- MERRICK, M.; J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. Microbiol. Rev., v.59, p.604-622, 1995.
- MICHEL-REYDELLET, N.; KAMINSKI, P. A. *Azorhizobium caulinodans* PII and GlnK proteins control nitrogen fixation and ammonia assimilation. J. Bacteriol. v.181, No.8, p.2655-2658, 1999.

- MOGENSTERN, E.; OKON, Y. the effect of *Azospirillum brasilense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum biocolor* x *Sorghum sudanense*. Aris Soil Res. Rehabilitation, v.1 p.115-127, 1987.
- NINNEMANN, O. ; JAUNIAUX, J.; FROMMER, W. B. Identification of high affinity NH_4^+ transporter from plants. EMBO J. v.13, No.15, p.3464-3471, 1994.
- OKON, Y. *Azospirillum* as potential inoculant for agriculture. Trends Biotechn., v.3, p.223-228, 1985.
- PAREJKO, R. A.; WILSON, P. W. Regulation of nitrogenase synthesis by *Klebsiella pneumoniae*. Can. J. Microbiol. v.16, p.681-5, 1970.
- PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. FEMS Microbiol. Lett., v.55, p.95-101, 1984.
- POSTGATE, J. R. The fundamentals of nitrogen fixation. Cambridge, Cambridge Univ. Press. 252p, 1982.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.74, p.5463-5467, 1977.
- SOUPENE, E.; HE, L.; YAN, D.; KUSTU, C. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of ammonium/methylammonium transport B (AmtB) protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.95, p.7030-7034, 1998.
- SOUZA, E. M. Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes *nifA* e *nifB* de *Herbaspirillum seropedicae*. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, UFPR, 264p, 1990.

- STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N.; NAPOLI, C. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J. Bacteriol., v.169, p.5787-5797, 1987.
- TATÉ, R.; CERMOLA, M.; RICCIO, A.; IACCARINO, M.; MERRICK, M.; FAVRE, R.; PATRIARCA, E. J. Ectopic expression of the *Rhizobium etli* *amtB* gene affects the symbiosome differentiation process and nodule development. MPMI v.12, No.6, p.515-525, 1999.
- TIEN, T.M. ; GASKINS, M.H. ; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). App. Environ. Microbiol., v.37, p.1016-24, 1979.
- TRIPATHI, A. K.; KLINGMÜLLER, W. Temperature sensitivity of nitrogen fixation in *Azospirillum* spp, J. Gen. Microbiol., v.38, p.1238-1241, 1992.
- Van DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. J.Bacteriol., v.180, No. 10, p.2652-2659, 1998.
- VIEILLE, C.; ELMERICH, C. Characterization of an *Azospirillum brasilense* Sp7 gene homologous to *Alcaligenes eutrophus phbB* and to *Rhizobium meliloti nodG*. Mol. Gen. Genet., v.231, p.375-384, 1992.
- YAKUNIN, F. e HALLENBECK, P. C. *amtB* is necessary for NH_4^+ induced nitrogenase switch-off and ADP-ribosylation in *Rhodobacter capsulatus*. Livro de resumos do 12th International congress on nitrogen fixation. No.12.04, 1999.
- ZHANG, Y.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett. v. 152, p.195-204, 1997.